



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE SAÚDE

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**GLICO-ORALOMA DA GENGIVITE À PERIODONTITE**

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa*

*Para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária*

Por:

Bárbara Íris de Almeida Lourenço

Viseu - 2013





UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE SAÚDE

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**GLICO-ORALOMA DA GENGIVITE À PERIODONTITE**

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa*

*Para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária*

Orientador: Professora Doutora Marlene Barros

Co-Orientador: Professor Doutor Nuno Rosa

Por:

Bárbara Íris de Almeida Lourenço

VISEU - 2013



*-The best way to predict the future is to create it.-*  
Peter Drucker





## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Marlene Barros,  
Por todo o apoio e disponibilidade, e pela partilha da sua experiência.

Ao Professor Doutor Nuno Rosa,  
Pela sua disponibilidade e ajuda em momentos mais complicados durante a elaboração deste trabalho.

À Professora Doutora Maria José Correia,  
Pelos comentários, sugestões e incentivo.

Aos meus pais,  
Por todo o amor, pela atenção e pela preocupação em todas as etapas da minha vida.

Aos meus avós,  
Pelo apoio incondicional, amo-vos muito.

À minha irmã,  
Por ser o meu orgulho e a minha fonte de inspiração.

À minha amiga e colega Tânia Ângelo,  
Pela amizade e apoio incondicional, e pela convivência única ao longo destes 5 anos.

Aos amigos que fiz ao longo destes anos na Faculdade,  
Que os tornaram numa das melhores fases da minha vida.





## Resumo:

A doença periodontal constitui uma doença de elevada prevalência no mundo, pelo que o seu diagnóstico e prevenção se tornaram essenciais para a manutenção de um estado de saúde periodontal e para evitar em última instância a perda dentária. A origem da evolução da gengivite para periodontite é um fenómeno que ainda não obteve consenso, não sendo possível prever a progressão da doença.

O glico-Oralo da doença periodontal integra o conjunto de proteínas humanas glicosiladas existentes na cavidade oral associadas à doença periodontal. O presente estudo tem como finalidade elucidar os mecanismos moleculares e respetivas vias de sinalização que estão comprometidas nesta doença através da identificação das proteínas que participam na instauração da doença periodontal.

O estudo do proteoma salivar da doença periodontal permitiu a identificação de duas proteínas importantes que podem explicar a evolução da doença, e que se encontram alteradas, apresentando regulação aumentada. Uma delas é a proteína glicosilada *zinc-alfa-2-glicoprotein* (P25311), considerada um biomarcador tumoral e associada à obesidade. A sua inibição por TNF- $\alpha$  e diminuição da quantidade de expressão na periodontite crónica (-8,5) e o aumento significativo na periodontite agressiva (2,2), poderá torná-la num marcador da doença periodontal a considerar. A outra proteína potencialmente envolvida na doença periodontal é a *prostaglandin E synthase* (O14864), exclusiva da periodontite crónica, cuja produção é controlada por TNF- $\alpha$  e uma vez estimulada, pela COX-2, induz a produção de PGE<sub>2</sub>.

Os resultados obtidos provam o potencial dos estudos *in silico* permitindo, a partir da análise do proteoma salivar, estabelecer novos alvos para futuros estudos experimentais e identificação de potenciais biomarcadores salivares, visando a intervenção terapêutica, clínica ou de diagnóstico da doença periodontal.

**Palavras-chave:** Doença periodontal; Gengivite; Periodontite; Biomarcadores; Glico-Oralo.



## Abstract:

Periodontal disease is a disease with high prevalence in the world, so it's diagnosis and prevention have become essential for the maintenance of periodontal health status and ultimately to prevent tooth loss. The origin of the development of gingivitis to periodontitis is a phenomenon that has not yet reached consensus and it is not possible to predict disease progression.

The glyco-OralOme of periodontal disease includes the set of glycosylated human proteins existing in the oral cavity associated with periodontal disease. The present study aims to elucidate the molecular mechanisms and respective signaling pathways that are compromised in this disease through the identification of proteins involved in the initiation of periodontal disease.

The study of the salivary proteome of periodontal disease allowed the identification of two important proteins that can explain the evolution of the disease, and are altered with increased regulation. One is *zinc-alpha 2-glycoprotein* (P25311), a glycoprotein that is considered a tumor-associated obesity biomarker. Its downregulation by TNF - alpha and decreased amount of expression in chronic periodontitis (-8,5) and significant increase in aggressive periodontitis (2,2) can make it a marker for periodontal disease to consider. The other protein potentially involved in periodontitis is *prostaglandin E synthase* (O14864), exclusive of chronic periodontitis, whose production is controlled by TNF-alpha and once stimulated by COX-2, it induces the production of PGE<sub>2</sub>.

The obtained results prove the potential of in *silico* studies allowing, from the salivary proteome analysis, establish new targets for future experimental studies and identification of potential biomarkers salivary aiming at therapy intervention or medical diagnosis of periodontal disease.

**Keywords:** Periodontal disease; Gingivitis; Periodontitis; Biomarkers; Glico-OralOme;



# Índice

Nota introdutória .....	1
1. Introdução.....	2
1.1 Doença periodontal .....	2
1.1.1 Conceito e epidemiologia .....	2
1.1.3 Gengivite .....	3
1.1.4 Periodontite .....	4
1.2 A inflamação na doença periodontal .....	5
1.2.2 Processos inflamatórios no paciente com gengivite e periodontite .....	6
1.2.3 Principais factores que regulam a imunidade adaptativa na doença periodontal .....	7
1.2.4 Factores que regulam a reabsorção óssea na periodontite.....	8
1.2.5 Vias de sinalização associadas à diferenciação dos odontoblastos.....	15
1.3 Flora microbiana na doença periodontal .....	18
1.3.1 Adesão, coagregação e coadesão.....	19
1.3.2 Factores bacterianos que regulam o início da infecção da doença periodontal .....	21
1.4 Processos destrutivos na doença periodontal .....	21
1.4.1 Proteases e inibidores .....	22
1.5 Osteoimunologia .....	24
1.5.1 O osso e componentes imunológicos envolvidos.....	25
2. Objectivos .....	35
3. Materiais e Métodos.....	37
3.1 Técnicas utilizadas.....	38
3.1.1 Nos estudos de proteómica e não-proteómica.....	38
3.1.2 Ferramentas informáticas .....	38
3.2 Anotação dos dados obtidos pela bibliografia.....	40
3.2.1 Cálculo da regulação da proteína .....	42

3.3 Comparação entre o Oraloma da doença periodontal (gingivite, periodontite crónica e periodontite agressiva) e o total de anotações do Oralome.....	43
4. Resultados e discussão .....	45
4.1 Actualização do Oraloma das doenças periodontais .....	45
4.2 Proteoma da doença periodontal.....	48
4.2.1 Proteoma comum à gingivite e à periodontite crónica – identificação do glico-oraloma e do fosfoproteoma .....	49
4.2.2 O proteoma comum à periodontite crónica e agressiva - identificação do glico-oraloma e do fosfoproteoma .....	52
4.2.3 O proteoma comum à gingivite, à periodontite crónica e à periodontite agressiva - identificação do glico-oraloma e do fosfoproteoma .....	57
4.3 Identificação das proteínas quantificadas e exclusivas da doença periodontal .....	59
4.3. 1 Proteínas quantificadas .....	59
4.3. 2 Proteínas exclusivas da doença periodontal.....	65
4.3.3 Proteínas alteradas comuns às três doenças .....	67
5. As principais proteínas com dados de quantificação identificadas na doença periodontal.....	68
5.1. Quais os processos biológicos em que participam as proteínas.....	68
5.2 Quais as funções moleculares em que participam as proteínas .....	70
5.3 Quais as vias de sinalização em que participam as proteínas.....	71
6. As evidências para possíveis biomarcadores em doença periodontal.....	74
7. Glico-Oraloma da doença periodontal.....	76
8. Conclusão.....	78
9. Bibliografia .....	80
10. Anexos .....	90

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Vias de sinalização da osteoclastogénese. As vias de sinalização da proteína cinase activada por mitógeno (MAPK) estão envolvidas na apoptose, na diferenciação, migração e proliferação celular. ....	14
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de acção de RANKL, expresso por vários tipos celulares e a indução da osteoclastogénese através da sua ligação ao receptor RANK dos pré-osteoclastos.....	15
<b>Figura 3.</b> A ligação de RANK ao RANKL, leva ao recrutamento de moléculas adaptadoras, incluindo TRAF-6, que interagem com c-SRC ( <i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i> ) para estimular PI-3K/Akt, que regula tanto o citoesqueleto dos osteoclastos como a apoptose.....	16
<b>Figura 4.</b> Esquema representativo das vias de sinalização intracelulares implicadas na diferenciação de osteoclastos e estimuladas por RANK/RANKL. ....	17
<b>Figura 5.</b> Regulação da secreção de citocinas por leptina .....	26
<b>Figura 6.</b> Modulação da osteoclastogénese por SphK1 e S1P.....	28
<b>Figura 7.</b> Alterações na diabetes melitos associadas à doença periodontal. ....	34
<b>Figura 8.</b> Formação dos AGEs.....	34
<b>Figura 9.</b> Diagrama representativo do número de proteínas identificadas como estando presentes na gengivite, na periodontite crónica e na periodontite agressiva, de acordo com a informação depositada no OralCard.. ....	49
<b>Figura 10.</b> Diagrama representativo do total das proteínas comuns à gengivite e periodontite crónica e que se encontram depositadas no OralCard.. ....	50
<b>Figura 11.</b> Gráfico que representa as proteínas comuns à periodontite crónica e agressiva e proteínas que apresentam modificação pós-tradução.....	53
<b>Figura 12.</b> Diagrama representativo das proteínas comuns à gengivite, à periodontite crónica e à periodontite agressiva, que se encontram depositadas no OralCard.. .....	58
<b>Figura 13.</b> Identificação do universo das proteínas quantificadas relativamente à quantidade de expressão em cada uma das três patologias, a partir da lista presente no OralCard. ....	60
<b>Figura 14.</b> Identificação do universo das proteínas relativamente ao seu mecanismo pós-tradução e quantidade de expressão relativamente à alteração de expressão em cada uma das três patologias, a partir da lista presente no OralCard. ....	61
<b>Figura 15.</b> Gráfico representativo da quantificação das proteínas comuns à periodontite crónica e à periodontite agressiva.. ....	63



<b>Figura 16.</b> Identificação das proteínas exclusivas e comuns às 3 patologias a partir da lista de proteínas existente no OralCard. ....	66
<b>Figura 17.</b> Gráfico representativo da quantidade de expressão das proteínas comuns à periodontite crónica e agressiva e à gengivite.....	68
<b>Figura 18.</b> Diferença fraccional do oraloma da gengivite e periodontite crónica e agressiva em relação ao Oraloma normal.....	69
<b>Figura 19.</b> Diferença fraccional do oraloma da gengivite e periodontite crónica e agressiva em relação ao Oraloma normal (* valores com $p\text{-value}<0,05$ ).. ....	71
<b>Figura 20.</b> Diferença fraccional do oraloma da gengivite e periodontite crónica e agressiva em relação ao Oraloma normal.....	73

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Colunas de informação anotados manualmente para cada uma das proteínas identificadas. ....	42
<b>Tabela 2.</b> Catalogação das proteínas identificadas neste trabalho relativas à doença periodontal e depositadas na base de dados do OralCard.....	46

## Índice de abreviaturas

**AP-1** proteína activadora 1

**ATF** – factor de ativação da transcrição

**c-Fos** – Proto-oncogene c-Fos

**c-Jun** factor de transcrição AP-1

**ERK** cinase regulada por sinal extracelular

**IL-1** interleucina 1

**IL-6** interleucina 6

**IL-8** interleucina 8

**JNK** c-Jun NH(2)-terminal kinase

**LPS** lipopolissacarídeo

**MAPK** proteína cinase activada por mitogénio

**MMPs** metaloproteinases da matriz

**NFATC1** factor de transcrição

**NF-kB** factor nuclear kB

**OPG** osteoprotegerina

**OPN** osteopontina

**P. Gingivalis** Porphiromonas Gingivalis

**PGE2** prostaglandina E2

**PTH** hormona paratiróidea

**PTHPr** proteína relacionada com a hormona paratiróidea

**RANK** receptor para a ativação do factor nuclear kB

**RANKL** ligante do receptor do factor nuclear kapa B

**RGD** arginina, glicina, ácido aspártico

**TGF-  $\beta$**  factor de crescimento tumoral beta

**TNF- $\alpha$**  factor de necrose tumoral alfa

**Tregs** células T reguladoras



## **Nota introdutória**

O conhecimento científico tem gerado ao longo do tempo uma extensa quantidade de informação. Essa informação deve estar organizada por forma a não se perder. Com esse objectivo, foram criadas por especialistas as ontologias. O termo ontologia deriva do grego “ontos”, ser, e “logos”, palavra, e refere-se a estruturas organizadas a partir de conceitos e da interligação entre os mesmos, sendo caracterizadas pela sua uniformização e padronização aquando da recolha de evidências. Ao longo deste trabalho são usadas várias ontologias, correspondentes aos gráficos adaptados de ferramentas bioinformáticas, optando-se por manter a denominação em inglês uma vez que a sua tradução poderia reflectir-se numa perda de conceitos, induzindo o leitor em erro durante a sua análise e, permite assim, que estes possam ser consultáveis por toda a comunidade científica.

# 1. Introdução

## 1.1 Doença periodontal

### 1.1.1 Conceito e epidemiologia

A existência de um equilíbrio entre a população bacteriana e o hospedeiro, no qual não se verifica qualquer dano irreparável para os tecidos do hospedeiro bem como para o equilíbrio do microbiota oral, define o estado de saúde periodontal<sup>(3)</sup>. A doença periodontal é uma doença crónica, de carácter inflamatório e de etiologia multifatorial, decorrente do desequilíbrio entre a flora microbiana, o meio oral e os mecanismos imunológicos intrínsecos relativos à resposta do hospedeiro, ocasionando alterações no periodonto<sup>(3)</sup>.

A doença periodontal afecta cerca de metade da população mundial <sup>(4)</sup>. A prevalência e a severidade da doença aumentam com a idade, de tal forma que por volta dos 45 anos, 97-100% dos indivíduos apresentam alguma forma de doença periodontal<sup>(5)</sup>. Não só é uma doença prevalente oral como também constitui um factor de risco para a doença cardiovascular e para a doença pulmonar<sup>(5)</sup>. De uma forma geral, dentro da doença periodontal, podemos distinguir três condições, dependendo da gravidade e da progressão da mesma: a Gingivite e a Periodontite Crónica e a Agressiva <sup>(4)</sup>. Enquanto a gengivite é reversível, a periodontite é irreversível, tendo como consequência a reabsorção óssea<sup>(4)</sup>.

A classificação da doença periodontal tem sofrido alterações ao longo dos anos e actualmente o sistema aceite é a classificação proposta no *International Workshop for Classification of Periodontal Diseases* que decorreu em 1999, a qual acrescenta novos critérios para a distinção entre as doenças periodontais (*The periodontal disease classification system of American Academy of Periodontology*)<sup>(6)</sup>.

### 1.1.3 Gingivite

Durante a evolução da doença periodontal, a gengivite, condição reversível, pode regredir, manter-se estável ou evoluir para um estado mais progressivo e agressivo, a periodontite <sup>(7)</sup>.

Na presença de bactérias específicas, o hospedeiro inicia uma resposta de defesa, que pode ser não específica (inata). Na sequência de um primeiro contacto com os microrganismos, a resposta posterior que venha a ser desenvolvida torna-se específica (adquirida)<sup>(8)</sup>.

A manifestação clínica da doença decorre de acordo com a inter-relação entre os microrganismos presentes na placa e os tecidos do hospedeiro, e varia consoante as propriedades dos microrganismos e a capacidade do hospedeiro em resistir à agressão <sup>(9)</sup>.

Para a maioria dos clínicos, o primeiro sinal que enuncia a alteração na gengiva constitui a presença de hemorragia, que ocorre, após um acúmulo progressivo de placa bacteriana <sup>(7)</sup>. O posterior aparecimento de eritema linear gengival, define, a gengivite. Nesta doença, ocorre um desequilíbrio entre as bactérias e as defesas do hospedeiro, induzindo alterações vasculares e a formação de exsudato inflamatório<sup>(8)</sup>. A alteração da cor da gengiva, a hemorragia e o edema são manifestações clínicas que podem ser reversíveis aquando da eliminação da causa<sup>(10)</sup>. A vulnerabilidade das estruturas periodontais permite um melhor alcance dos agentes bacterianos e/ou seus produtos às áreas subjacentes, permitindo a formação de bolsas periodontais<sup>(11)</sup>.

Após os primeiros indícios de gengivite, se continuar a acumular-se progressivamente placa bacteriana durante alguns dias, podem verificar-se lesões no sulco gengival que se desloca mais profundamente e ocorre a migração e a proliferação de células do epitélio juncional, o que constitui a primeira etapa para formar bolsas periodontais, concomitantemente com a difusão em sentido apical e lateral da lesão <sup>(8)</sup>. A vasodilatação e o aumento do número de células inflamatórias polimorfonucleares acompanham a progressão da lesão, invadindo a região das fibras de colagénio <sup>(12)</sup>.

#### 1.1.4 Periodontite

A periodontite apresenta as mesmas características clínicas da gengivite acrescentando a perda de inserção conjuntiva, presença de bolsa periodontal e perda óssea<sup>(13)</sup>.

Cerca de uma semana depois das primeiras alterações na gengiva, acompanhado pelo perfil inflamatório, também se verifica a perda de 6% do colagénio existente no periodonto e entre os 15 a 20 dias inicia-se a perda óssea<sup>(10)</sup>. A doença encontra-se estabelecida nesta etapa e pode permanecer estável ou evoluir para um estado avançado<sup>(10)</sup>. No estado avançado, inclui um quadro com superfície gengival ulcerada, supuração, áreas de fibrose, destruição do ligamento periodontal, hemorragia, bolsa periodontal que pode apresentar profundidade entre 5 a 6 mm, mobilidade dos elementos dentários e possível perda dos mesmos<sup>(8)</sup>.

A periodontite pode ser classificada em periodontite crónica e agressiva<sup>(7)</sup>. Estas doenças podem ser caracterizadas pela extensão da perda óssea (localizada ou generalizada), e a severidade da doença (leve, moderada, avançada)<sup>(7)</sup>.

A maioria dos pacientes apresenta periodontite crónica, cujo grau de destruição depende da presença de placa bacteriana, placa mineralizada e cálculos<sup>(14)</sup>. No entanto, a periodontite agressiva induz uma perda de inserção mais rápida e a destruição óssea e a quantidade de destruição visível não é compatível com o número de depósitos microbianos<sup>(14)</sup>. A forma localizada da periodontite agressiva, ocorre apenas em 5-10% da população e está associada principalmente à presença de *Actinobacillus actinoycetemcomitans*<sup>(15)</sup>. A periodontite agressiva, consiste numa forma rara mas progressiva da doença periodontal, que se manifesta na maioria dos casos na adolescência e caracteriza-se por uma rápida perda de inserção e reabsorção óssea o que a distingue da periodontite crónica<sup>(15)</sup>.

## 1.2 A inflamação na doença periodontal

### 1.2.1 Principais factores que regulam o início da inflamação da doença periodontal

As citocinas são um dos principais factores que regulam o início da inflamação na doença periodontal<sup>(8)</sup>. São produzidas por células epiteliais, fibroblastos, e fagócitos (neutrófilos e macrófagos) na fase aguda e na fase crónica precoce da inflamação, e por linfócitos na imunidade adaptativa e são responsáveis por sinalizar outras células como os fibroblastos, a produzirem prostaglandinas e metaloproteinases da matriz (MMPs)<sup>(12)</sup>. As principais citocinas envolvidas na resposta inflamatória são: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e o factor de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )<sup>(16)</sup>.

- IL-1: existe nas formas alfa e beta. Tem como função a activação dos macrófagos e a estimulação da biossíntese de prostaglandinas pelos macrófagos e fibroblastos<sup>(17)</sup>. Pode ainda exercer uma acção sobre os fibroblastos, ao promover o reparo ou a destruição da matriz celular<sup>(17)</sup>;
- IL-6: constitui um factor de crescimento para linfócitos B, regulando a produção de imunoglobulinas o que permite exacerbar a inflamação<sup>(17)</sup>; Quando está associada a IL-1, permite a ativação dos linfócitos T helper (Th)<sup>(17)</sup>. Esta interleucina tem também um papel reconhecido na reabsorção óssea<sup>(17)</sup>;
- IL-8: exibe acção quimiotática para neutrófilos<sup>(17)</sup>;
- O TNF- $\alpha$  é uma citocina pleotrópica que está implicada em diversas funções, desde a migração celular à destruição tecidual, bem como regula a produção de IL-1 $\beta$  e IL-6<sup>(12)</sup>. Além disso, está relacionado com a degradação da matriz extracelular e reabsorção óssea, através de mecanismos que promovem a secreção de MMPs (Metaloproteinases da matriz) e da proteína RANKL (ligante do receptor do factor nuclear kappa- B)<sup>(18)</sup>.



As prostaglandinas são outro factor regulador do início da inflamação da doença periodontal.<sup>(8)</sup> Elas são secretadas a partir da hidrólise dos fosfolípidos da membrana celular, com a consequente conversão do ácido araquidónico pelas cyclooxygenases (COX-1 e COX-2)<sup>(8)</sup>. A prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) é um potente estimulador da reabsorção óssea alveolar e também pode ser produzida por células do ligamento periodontal<sup>(8)</sup>. A secreção desta prostaglandina é aumentada pela ação da IL-1 $\beta$  (interleucina 1 beta), do TNF- $\alpha$  e da hormona paratiróide <sup>(12)</sup>.

### **1.2.2 Processos inflamatórios no paciente com gengivite e periodontite**

Na doença periodontal, acompanhando o desenvolvimento da reacção inflamatória, observa-se um aumento do exudato no sulco gengival ou na bolsa periodontal, decorrente da interacção específica entre hospedeiro e microrganismo que ocorre no local<sup>(19)</sup>. Como resultado, o fluido crevicular ou da bolsa periodontal passa a exhibir microrganismos, células epiteliais, plasma sanguíneo, células inflamatórias e outros componentes da resposta inflamatória/imunológica<sup>(12)</sup>.

Tanto a resposta inata como a adaptativa são compostas por elementos celulares e humorais<sup>(17)</sup>. O tempo de duração e o tipo de resposta que se estabelecerá depende das características patogénicas do agente agressor e da capacidade de defesa do seu hospedeiro <sup>(8)</sup>. A resposta inata ocorre antes da adaptativa e é iniciada pelo acúmulo de microrganismos<sup>(19)</sup>. Representa uma resposta inflamatória, inespecífica, caracterizada por alterações da microvascularização local (aumento do fluxo sanguíneo, da pressão hidrostática vascular e aumento da permeabilidade vascular), seguida pela migração de leucócitos, proteínas e líquido do meio intravascular para o espaço extravascular onde ocorreu a infeção<sup>(19)</sup>. Os principais leucócitos envolvidos nesta etapa da resposta imune são os neutrófilos<sup>(17)</sup>.

A partir do momento em que os microrganismos patogénicos específicos, permanecem no local e superam a defesa inata, estabelece-se a resposta

imune adaptativa<sup>(19)</sup>. Este tipo de resposta é específica e envolve uma componente celular e uma componente humoral<sup>(19)</sup>. Na componente celular de defesa estão presentes neutrófilos (PMNs), mastócitos, macrófagos, linfócitos T e B<sup>(19)</sup>. A defesa humoral pode envolver moléculas produzidas independentemente de estimulação celular como as proteínas do complemento, ou componentes resultantes da estimulação celular como as imunoglobulinas e as citocinas<sup>(20)</sup>.

Assim, se a lesão periodontal aguda persiste sem resolução e os tecidos não regressam ao estado de homeostasia inicial, os antígenos bacterianos são processados e apresentados ao sistema imunitário adaptativo por macrófagos e células dendríticas<sup>(21)</sup>.

### **1.2.3 Principais factores que regulam a imunidade adaptativa na doença periodontal**

Duas classes de linfócitos reconhecem as células apresentadoras de antígenos microbianos intracelulares e extracelulares: os linfócitos T e linfócitos B respectivamente<sup>(17)</sup>. Os linfócitos B possuem moléculas de imunoglobulinas (Ig) na sua membrana celular, que funcionam como recetores para antígenos extracelulares<sup>(17)</sup>. Uma vez estimulados os linfócitos B diferenciam-se em plasmócitos secretores de imunoglobulinas, os anticorpos (Ab), destinados a ligar (opsonizar) microrganismos e outro material estranho que se encontre nos espaços extracelulares (imunidade humoral)<sup>(12)</sup>. As células T são efectoras da imunidade mediada por células<sup>(12)</sup>. O receptor específico das células T, reconhece fragmentos de péptidos de patógenos apresentados por macrófagos e/ou células dendríticas<sup>(12)</sup>. A activação do receptor de células T requer o complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II). Uma vez activados os linfócitos T vão ativar os linfócitos B<sup>(12)</sup>.

Os linfócitos T são classificados com base na expressão na sua membrana celular de moléculas acessórias dos seus receptores específicos, as proteínas de CD4 (linfócitos Th) e as CD8 (linfócitos Tc)<sup>(8)</sup>. As células T CD4+ (Células T-helper) incluem duas subpopulações, as Th1 e Th2, que se

distinguem pelo tipo de citocinas que produzem. As células Th1 segregam interleucina-2 e interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), enquanto que as células Th2 produzem IL-5, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-13<sup>(8)</sup>. Ambos os tipos de células produzem IL-3, TNF- $\alpha$  e factor estimulador de colónias de macrófagos-granulócitos (GM-CSF)<sup>(8)</sup>. O principal papel de Th1, IL-2 e IFN- $\gamma$  é aumentar as respostas mediadas por células, considerando que IL-4 inibe as respostas mediadas por células<sup>(11)</sup>.

Dois outros subconjuntos de células T CD4 bem definidas, Th17 e células T reguladoras (Tregs), efectuem papéis antagónicos atuando como células efectoras e supressoras respectivamente<sup>(11)</sup>. As Tregs têm um papel protector nos danos do tecido periodontal e regulam especificamente a activação, proliferação e a função efectora de células T activadas<sup>(11)</sup>. A IL-10, TGF- $\beta$  (factor de transformação do crescimento beta) e CTLA-4 (molécula 4 associada a linfócitos-T) permitem a diminuição da progressão da doença periodontal<sup>(8)</sup>.

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> (células T citotóxicas) são células efectoras e também segregam as citocinas comuns a linfócitos Th1 e a Th2<sup>(21)</sup>.

#### **1.2.4 Fatores que regulam a reabsorção óssea na periodontite**

À medida que a doença progride para estágios mais avançados, ocorre uma destruição tecidual significativa envolvendo reabsorção óssea e perda de colagénio<sup>(22)</sup>. A remodelação do tecido ósseo envolve a deposição de matriz óssea pelos osteoblastos e a reabsorção pelos osteoclastos e as células precursoras de osteoclastos e odontoblastos (macrófagos e células estromais)<sup>(10)</sup>.

O equilíbrio entre a deposição e a reabsorção de matriz óssea é regulado por parâmetros físicos (estímulos mecânicos) e libertação de polipeptídeos (hormonas como PGE<sub>2</sub> (prostaglandina E<sub>2</sub>), PTH (hormona paratiróidea), e citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ )<sup>(10)</sup>. As células Th1, ao produzirem citocinas inflamatórias, participantes na destruição dos tecidos (TGF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, MMPs (metaloproteinases), PGE<sub>2</sub>) e as células Th2 ao

produzirem citocinas anti-inflamatórias (TGF-alfa, IL-4, IL-10 e IL-12) também são factores que regulam a osteoclastogénese <sup>(2)</sup>.

M-CSF (factor estimulador de colónias de macrófagos) é um factor essencial na diferenciação dos osteoclastos e um factor de sobrevivência para os osteoclastos <sup>(23)</sup>. A ativação de M-CSF após ligação aos seus receptores conduz à expressão de genes alvo específicos de osteoclastos <sup>(23)</sup>.

Outro factor regulador da reabsorção óssea constitui o ligante para o receptor activador do factor nuclear kB (RANKL) expresso por osteoblastos, fibroblastos, células B e citocinas como IL-1 beta, TNF-alfa e a IL-6 <sup>(10)</sup>. O RANKL ao ligar-se ao recetor RANK desencadeia a diferenciação, activação e sobrevivência de osteoclastos e seus precursores <sup>(10)</sup>. O RANK, que é o receptor para a activação do factor nuclear kB (NF-kB) está expresso em altos níveis em precursores osteoclásticos, e em osteoclastos e cementoclastos, e é exigido para a activação e diferenciação dos osteoclastos <sup>(24)</sup>.

A osteoprotegerina (OPG), é outro factor importante que permite a regulação da osteoclastogénese ao competir com RANK pelo mesmo receptor RANKL <sup>(25)</sup>. É expressa por osteoblastos, cementoblastos, fibroblastos e linfócitos T e inibe a activação dos osteoclastos e a reabsorção de osso ao ligar-se com grande afinidade ao seu ligante RANKL, prevenindo assim que este se ligue ao seu receptor RANK. É ainda responsável pela indução da apoptose em células osteoclásticas <sup>(22)</sup>.

Os cementoblastos possuem um papel muito importante na regulação do equilíbrio entre a saúde e doença no periodonto <sup>(22)</sup>. Pensa-se que os cementoblastos exercem uma resposta protectora, aumentando os níveis de OPG e diminuição de RANKL, quando estimulados <sup>(12)</sup>.

Os osteoclastos por sua vez, participam durante a reabsorção, ao dissolvem a matriz mineralizada, fazendo endocitose desta, transporte e libertação contínua dos componentes da matriz óssea <sup>(25)</sup>.

Todas as células ósseas, incluindo condrócitos, osteoblastos e osteoclastos são influenciadas pela proteína AP1 (proteína activadora 1), que está implicada em diversos processos biológicos como proliferação, diferenciação, apoptose e oncogénese. É um factor de transcrição, composta por uma grande variedade de dímeros de membros da proteína Fos, proteínas Jun e proteínas ATF (Factor de transcrição 2) <sup>(2)</sup>. A atividade de AP1 consiste

na conversão de sinais extracelulares a partir, por exemplo, dos receptores do factor de crescimento, através da proteína cinase activada por mitogénio (MAPK) em mudanças na expressão genética via expressão de genes alvo receptivos a AP1<sup>(10)</sup>

Existem vários factores responsáveis pela estimulação de RANKL e, desta forma induzem a reabsorção óssea<sup>(22)</sup>. Eles incluem: a PGE<sub>2</sub> (prostaglandina E2), o TNF-alfa (factor de necrose tumoral alfa), várias citocinas, TGF-beta, hormonas calcitrópicas, LPS microbiano, PTHPr (proteína relacionada com a hormona paratiróidea), PTH (hormona paratiróidea) e OPN (osteopontina)<sup>(10)</sup>.

A PGE<sub>2</sub> medeia parcialmente a indução da expressão de RANKL ao favorecer a activação de recetores como RANK, RANKL<sup>(10)</sup>.

O factor de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), produzido por mastócitos e macrófagos, induz a destruição óssea mediada por osteoclastos<sup>(10)</sup>. É responsável por exercer actividades pró-inflamatórias, ao induzir a produção de citocinas inflamatórias e aumento da permeabilidade das células endoteliais vasculares<sup>(2)</sup>. Induz a síntese de proteases, como a collagenase e metaloproteinases da matriz (MMPs)<sup>(2)</sup>. É considerado que o TNF- $\alpha$  pode actuar através do aumento directo da expressão de RANK, em macrófagos e aumentar a expressão de RANKL em células do estroma<sup>(22)</sup>. Na presença de TNF- $\alpha$ , a diferenciação de osteoclastos é induzida por baixas concentrações de RANKL e o TNF- $\alpha$  aumenta os efeitos de RANKL<sup>(22)</sup>.

As citocinas inflamatórias estimulam o crescimento e a diferenciação das células precursoras dos osteoclastos e a actividade dos osteoclastos maduros, como por exemplo a IL-1 (interleucina-1) através de um domínio especial denominado gp 130. A IL-1 $\beta$  é a citocina mais activa envolvida no processo de reabsorção óssea<sup>(26)</sup>. É produzida por monócitos, macrófagos e osteoblastos, e funciona como um mensageiro na comunicação de sinais de reabsorção aos osteoclastos<sup>(11)</sup>. Estimula a expressão de RANKL ao nível do mRNA nas células do ligamento periodontal, mas também regula a diferenciação e a função osteoclástica por um mecanismo independente de RANK/RANKL<sup>(11)</sup>.

O factor de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ) facilita a adesão leucocitária às paredes dos vasos e à matriz extracelular nos locais inflamatórios, por aumento da expressão de integrinas<sup>(26)</sup>. A activação de

células B, que se diferenciariam em plasmócitos secretores de imunoglobulinas, além de produzirem RANKL, também activam o desenvolvimento de osteoclastos e promovem a destruição do tecido duro <sup>(11)</sup>.

Hormonas calciotrópicas são importantes na formação de células clásticas ao estimularem a osteólise e ao se ligarem a receptores em osteoblastos, aumentando a produção de RANKL <sup>(12)</sup>.

Os LPS (lipopolissacarídeos) microbianos aumentam nos osteoblastos a produção de RANKL, IL-1, PGE<sub>2</sub> e TNF-alfa, induzindo a actividade, viabilidade e diferenciação clástica <sup>(2)</sup>. Os LPS induzem ainda a expressão de TNF-α e IL-1 β em precursores de osteoclastos <sup>(27)</sup>. Alteram ainda a actividade de RANKL ao reduzir a expressão de RANK e de receptores de factor de estimulação de colónias de macrófagos (M-CSF) <sup>(22, 27)</sup>. A supressão da expressão de OPG pela PGE<sub>2</sub> está envolvida na formação de osteoclastos induzida pelo LPS <sup>(27)</sup>.

A proteína relacionada com a hormona paratiróidea (PTHrP) também contribui para a osteoclastogénese <sup>(2)</sup>. Esta proteína é um factor de actuação local, produzido por células de origem epitelial, conhecidas como *reticulum estelar* e pelas células da bainha epitelial de *Hertwig* <sup>(2)</sup>. O papel protector contra a reabsorção óssea, induzido pela OPG pode ser desregulado por PTHrP <sup>(25)</sup>. Ficou demonstrado que os cementoblastos respondem a PTHrP aumentando a síntese de RANKL <sup>(27)</sup>. A PTHrP sozinha não promove a osteoclastogénese, sugerindo que os osteoblastos são necessários para promover a produção de RANKL em resposta a PTHrP <sup>(10)</sup>.

A PTH (hormona paratiróidea) estimula a reabsorção óssea, porém permite a formação de osso quando injectado em pequenas doses diárias <sup>(2)</sup>. Sugere-se que isto ocorra porque o PTH reduz a apoptose osteoblástica, prolongando a vida do osteoblasto e estimula a sua função na síntese de colagénio <sup>(2)</sup>. A PTH liga-se a receptores nos osteoblastos, que estimulam a sinalização celular dos osteoclastos <sup>(28)</sup>. Este efeito protector é mediado pela regulação da actividade osteoblástica, com secreção de RANKL e OPG <sup>(28)</sup>.

Tanto os linfócitos B quanto os T possuem receptores para a PTH, sugerindo que a hormona possa actuar directamente sobre ambas as células <sup>(27)</sup>. A proteína relacionada com a hormona paratiróidea (PTH) é produzida por células de origem epitelial, células de origem mesenquimal, foliculares,

osteoblastos e cementoblastos e estimula a  $PGE_2$ , sugerindo que as prostaglandinas também podem enviar sinais de reabsorção óssea<sup>(26)</sup>.

A osteopontina (OPN) parece ser uma das mais importantes proteínas da matriz extracelular (ECM) envolvida nas actividades de formação, migração, adesão e reabsorção pelos osteoclastos<sup>(2)</sup>. A OPN é uma glicoproteína fosforilada com uma sequência de adesão RGD (arginina, glicina, ácido aspártico) que promove a ligação a receptores das integrinas existentes em vários tipos de células<sup>(27)</sup>. A sequência RGD é o factor principal que afecta a adesão do osteoclasto antes da reabsorção<sup>(27)</sup>. A OPN é sintetizada e secretada por osteoblastos, osteócitos, e osteoclastos e possui ações anti e pró-inflamatórias<sup>(28)</sup>. Como um agente pró-inflamatório, age como quimiotático, facilita a adesão e modula as funções das células T, monócitos e macrófagos<sup>(28)</sup>. Interage com as integrinas e CD44 e aumenta a expressão da resposta imunológica de Th1 estimulando a produção da IL-12 e inibindo a resposta de Th2<sup>(2)</sup>. Como um agente anti-inflamatório, inibe a produção de óxido nítrico (NO), que pode estimular ou inibir a actividade osteoclástica de acordo com a sua concentração e a de  $PGE_2$ <sup>(25)</sup>. A sua expressão é estimulada em resposta a citocinas pró-inflamatórias no início da resposta imunológica e também pelo estímulo mecânico, como traumas dentários em zonas de compressão tecidual ou forças ortodônticas<sup>(27)</sup>.

Existem várias proteínas envolvidas nos processos de mineralização entre elas: a sialoproteína óssea (BSP), a fibronectina e as SIBLINGs (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein*)<sup>(10)</sup>.

A sialoproteína óssea (BSP) constitui uma proteína que participa no início da mineralização<sup>(28)</sup>. É quimiotática para os pré-cementoblastos e promove a sua adesão e diferenciação<sup>(28)</sup>. A sialoproteína dentinária (DSP) e a fosfoproteína dentinária (DPP) induzem a migração de neutrófilos<sup>(10)</sup>.

A fibronectina é uma glicoproteína da matriz extracelular, encontrada sob duas formas básicas: solúvel no plasma e insolúvel nos tecidos<sup>(25)</sup>. A forma tecidual é sintetizada pelos fibroblastos e células endoteliais e está envolvida na adesão, migração, diferenciação e crescimento celular<sup>(28)</sup>. A fibronectina também pode contribuir para a activação fagocitária e está presente no tecido conjuntivo, aquando do recrutamento dos fagócitos para sofrerem activação<sup>(2)</sup>.

A família de proteínas não-colagénio, componentes da matriz extracelular do osso e dentina: DSPP (*dentin sialophosphoprotein*), OPN (*osteopontin*), BSP (*bone sialoprotein*), Dmp-1 (*matrix extracellular phosphoglycoprotein*), colectivamente designadas de SIBLINGs (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein*) são importantes para a mineralização destes tecidos e podem interferir com a cascata do complemento diminuindo ou mesmo eliminando as respostas inflamatórias que envolvem a via alternativa do complemento <sup>(10)</sup>.

Aquando da desmineralização, o osteoclasto acidifica o meio para promover a dissolução do mineral ósseo e segue-se a digestão enzimática da matriz orgânica, característica da desmineralização<sup>(25, 29)</sup>. Estas células são enriquecidas com enzimas lisossomais, resultando em uma grande actividade biosintética e não de fagocitose<sup>(27)</sup>. As collagenases, catepsinas lisossomais e metaloproteinases são as enzimas mais importantes que degradam a matriz óssea<sup>(10)</sup>.

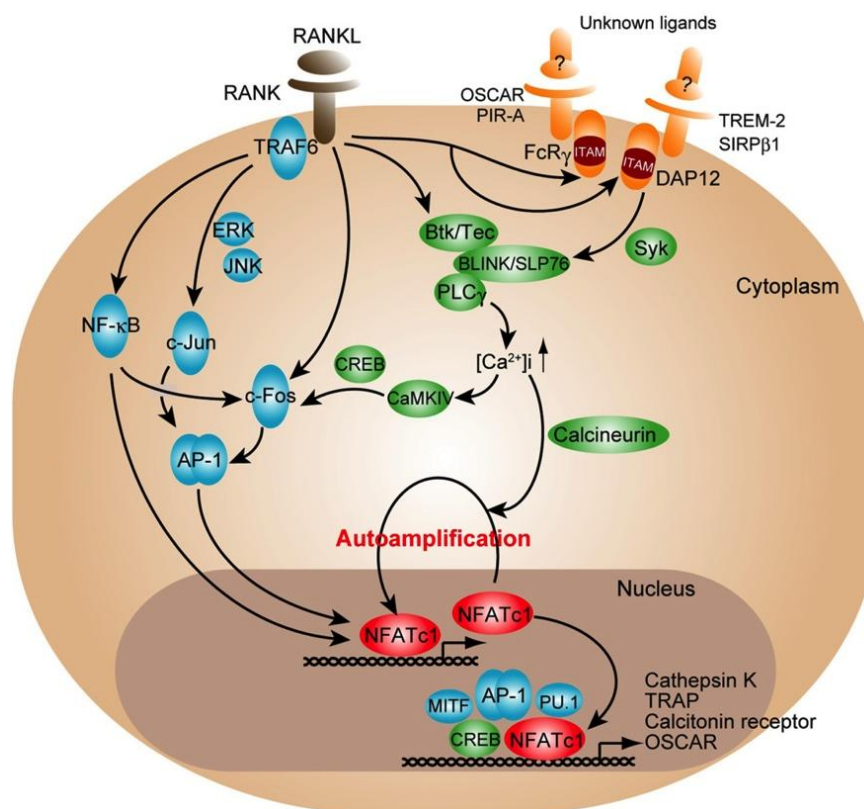
A regulação das células diferenciadas é também efectuada por MAP ou ERK (cinases reguladoras de sinal extracelular) que constituem moléculas de sinalização intracelular, envolvidas em diversas funções, incluindo a regulação da meiose, a mitose, e funções pós-mitóticas em células diferenciadas<sup>(23)</sup>. Muitos estímulos diferentes, incluindo factores de crescimento, citocinas, infecção por vírus, ligantes para os receptores acoplados às proteínas G heterotriméricas, agentes de transformação e cancerígenos, activam a via ERK, representada na figura 1 <sup>(11)</sup>.

Como se pode verificar na figura 1, também existem moléculas que inibem a concentração de RANKL e a reabsorção óssea, como é o caso do IFN- $\gamma$  (interferão gama), que bloqueia RANKL através da activação de JNK <sup>(43)</sup>. Os monócitos JNK1 (c-Jun N-terminal kinases) protegem contra a apoptose induzida por RANKL independentemente da fosforilação de Jun<sup>(43)</sup>. RANKL estimula a JNK e, subsequentemente provoca a activação do factor de transcrição de c-Jun, um factor de transcrição essencial para a formação de osteoclastos <sup>(12)</sup>.

Além disso, a expressão de NFATc1 (factor de transcrição) é fortemente regulada positivamente por RANKL<sup>(2)</sup>. Ao que tudo indica, NFATc1 atuando



como um gene alvo directo na sinalização de Fos e RANKL poderá ser um novo regulador chave para a diferenciação terminal dos osteoclastos<sup>(30)</sup>.

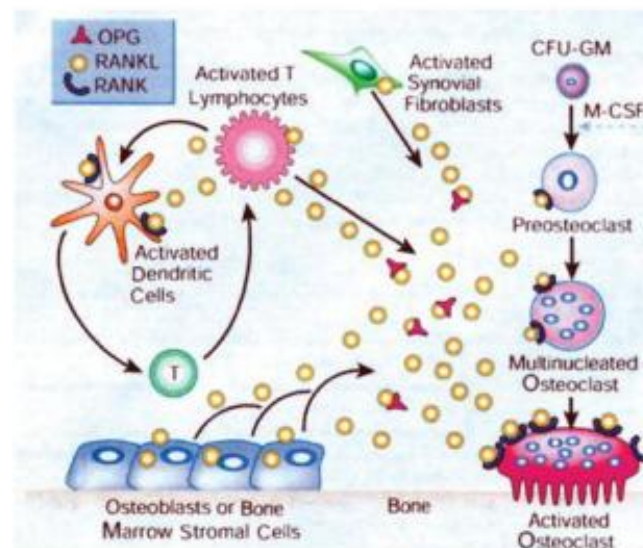


**Figura 1.** Vias de sinalização da osteoclastogénese. As vias de sinalização da proteína cinase activada por mitógeno (MAPK) estão envolvidas na apoptose, na diferenciação, migração e proliferação celular. A ligação de RANKL a RANK recruta TRAF-6 (receptor TNF associado ao factor 6) para activar todas as três vias activadas também pela proteína cinase activada por mitógeno (MAPK), ou seja, ERK (cinase regulada por sinal extracelular), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), e p38, bem como PI-3K (*fosfatidilinositol 3-kinase*) e NF- $\kappa$ B. Isto conduz à activação de reguladores como c-fos, AP-1 e NFATc1. Os receptores co-estimuladores de RANK que contêm as proteínas adaptadoras FcR $\gamma$  e DAP12 recrutam a cinase Syk (*spleen tyrosine kinase*) e PLC- $\gamma$  (*phosphoinositide-Specific Phospholipase C*), e ocorre a sinalização de cálcio que é crítica para a estimulação de NFATc1<sup>(31)</sup>.

### 1.2.5 Vias de sinalização associadas à diferenciação dos odontoblastos

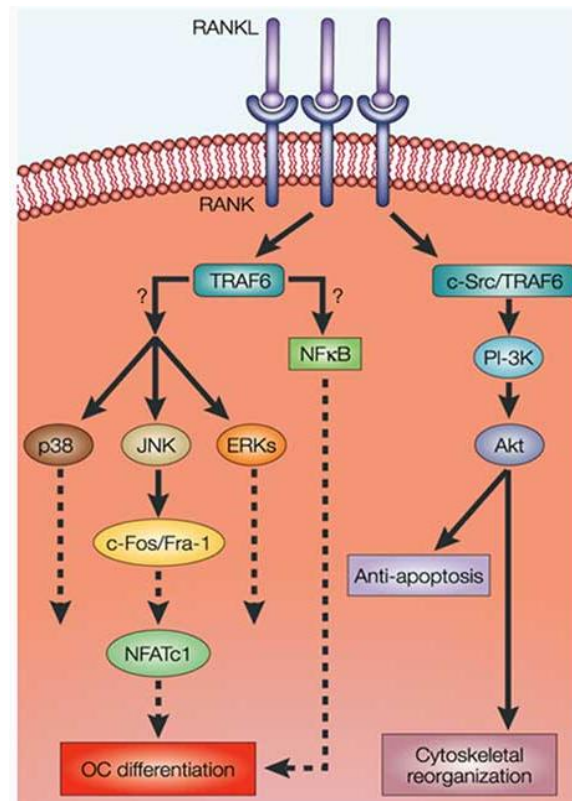
RANKL ao interagir com o receptor activador do factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL), activa enzimas MAPKs (p38, cinase regulada por sinais extracelulares (ERK) e cinase N-terminal Jun) e estimula factores de transcrição promovendo a osteoclastogénese <sup>(10)</sup>.

A ligação de RANKL ao pré-osteoclasto ocorre no estágio em que estas células se diferenciam em unidades formadoras de colónias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) e, que na presença de M-CSF induzem a diferenciação de pré-osteoclastos em células multinucleadas que se tornam osteoclastos maduros como é apresentado a seguir na figura 2 <sup>(2)</sup>.



**Figura 2.** Mecanismo de acção de RANKL, expresso por vários tipos celulares e a indução da osteoclastogénese através da sua ligação ao receptor RANK dos pré-osteoclastos <sup>(2)</sup>. A osteoprotegerina inibe a activação dos osteoclastos e a reabsorção óssea ao ligar-se com grande afinidade ao seu ligante RANKL, prevenindo assim que este se ligue ao seu receptor RANK <sup>(2)</sup>.

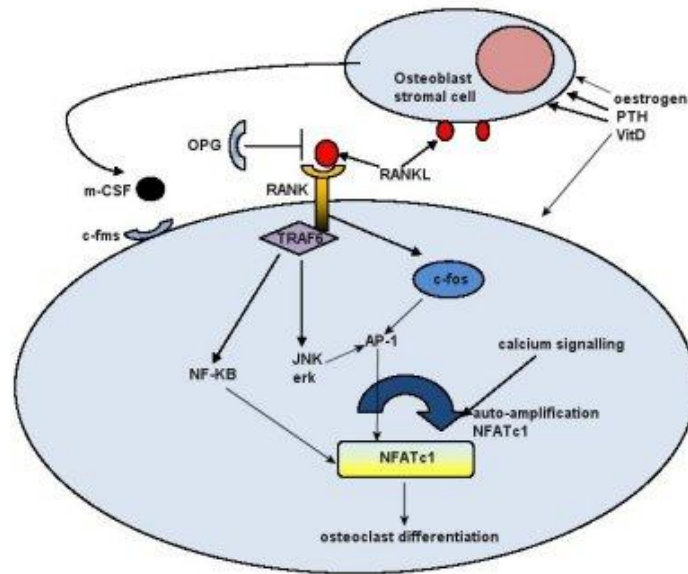
Na figura 3, podemos verificar que a estimulação de M-CSF activa as vias de sinalização MAPK, tais como as vias da cinase regulada por sinal extracelular (ERK), fosfatidilinositol 3-cinase (P13 K) e Akt.



**Figura 3.** A ligação de RANK ao RANKL, leva ao recrutamento de moléculas adaptadoras, incluindo TRAF-6, que interagem com c-SRC (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase*) para estimular PI-3K/Akt, que regula tanto o citoesqueleto dos osteoclastos como a apoptose <sup>(1)</sup>.

A ligação de RANKL presente em precursores de osteoclastos adicionalmente com a de M-CSF acabará por resultar na diferenciação e fusão dos precursores dos osteoclastos, resultando em uma célula activada madura<sup>(32)</sup>. A ligação de RANKL para RANK inicia uma cascata de transdução de sinal que resulta na expressão de um certo número de genes, incluindo a catepsina K, o receptor de calcitonina e da fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP)<sup>(1)</sup>.

Como se pode observar na figura 4, para o início da transdução de sinal nesta cascata, o factor de necrose tumoral do receptor do factor associado (TRAF-6), liga-se ao domínio citoplasmático de RANK iniciando pelo menos três cascatas de sinalização, incluindo a do factor nuclear NF- $\kappa$ B e ativação da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) o que resulta na estimulação do factor de transcrição AP-1 <sup>(32)</sup>.



**Figura 4.** Esquema representativo das vias de sinalização intracelulares implicadas na diferenciação de osteoclastos e estimuladas por RANK/RANKL<sup>(32)</sup>.

Através da figura 4, podemos verificar que os complexos c-Jun/c-Fos associam-se com as proteínas da família NFAT, e subsequentemente regulam a transcrição de genes específicos em células T e alguns outros tipos de células, o que conduz à expressão de genes alvo específicos de osteoclastos<sup>(1)</sup>.

Por outro lado, uma cascata de sinalização diferente pode ser produzida pela ligação de TNF- $\alpha$  ao seu receptor, TNFR1, que produz uma cascata de transdução de sinais que se assemelha à da interação RANK-RANKL, e regula também a diferenciação e função dos osteoclastos por um mecanismo independente de RANK-RANKL<sup>(26)</sup>.

### 1.3 Flora microbiana na doença periodontal

A cavidade oral apresenta uma flora microbiana bastante diversificada que inclui vários tipos de microrganismos, cerca de 500 espécies bacterianas, com diferenças significativas nas suas composições qualitativa e quantitativa<sup>(19)</sup>.

A placa bacteriana ou biofilme dentário é uma entidade estrutural que resulta da colonização e do crescimento de microrganismos organizados numa comunidade sobre a superfície dos dentes e tecidos moles e está presente em toda a cavidade oral<sup>(33)</sup>. O biofilme dentário está instalado numa matriz constituída por polímeros extracelulares, aderidos entre si ou a uma superfície sólida, como esmalte, cimento, dentina, próteses, implantes, entre outras e oferece uma grande protecção às bactérias<sup>(33,34)</sup>. As bactérias presentes agridem os tecidos periodontais, que podem responder com a quebra da homeostasia, devido ao desequilíbrio decorrente do aumento da agressão bacteriana ou diminuição das defesas orgânicas<sup>(34)</sup>. Os factores de virulência bacteriana são constituintes ou metabolitos bacterianos que permitem a quebra da homeostasia ou dos mecanismos protectores do hospedeiro, ou ainda podem causar o início ou progressão da doença<sup>(13)</sup>. As espécies microbianas presentes na placa bacteriana interagem entre si, libertando produtos proteolíticos e nocivos e enzimas solúveis que afectam os tecidos de sustentação do periodonto e influenciam, deste modo, o curso da doença, ao favorecerem o crescimento, a defesa ou o aumento do potencial de virulência de outros microrganismos<sup>(35)</sup>.

Entre as diversas bactérias que habitam a cavidade oral, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* são consideradas verdadeiros patógenos periodontais, ou seja, estão envolvidas directamente no início e progressão da doença periodontal<sup>(35)</sup>. A bactéria *Actinobacillus actinomycetemcomitans* é tradicionalmente associada a casos de periodontite agressiva e apresenta maior ocorrência em indivíduos jovens, no entanto, também pode ser encontrada na periodontite crónica e *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* estão também associadas à periodontite crónica<sup>(36)</sup>.

Após uma invasão, há uma resposta do meio ambiente, uma modificação do habitat resultante da presença de uma ou mais populações de bactérias, uma mudança que pode afectar o tamanho, a actividade ou a sobrevivência da população que invade um ou mais segmentos da comunidade<sup>(24)</sup>.

### 1.3.1 Adesão, coagregação e coadesão

Uma das marcas da patogénese é a capacidade do microrganismo patogénico invadir os tecidos circundantes<sup>(34)</sup>. As bactérias podem sobreviver, replicar e, eventualmente ser libertadas para o ambiente extracelular<sup>(34)</sup>. Actualmente, as evidências de invasão da célula hospedeira existem sobretudo para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum* <sup>(34)</sup>.

A capacidade invasiva do *A. actinomycetemcomitans* foi demonstrada *in vitro*, utilizando uma linha de células de carcinoma epidermóide humano da cavidade oral <sup>(19)</sup>. Após a absorção, *A. actinomycetemcomitans* é libertado a partir da vesícula de endocitose, replica-se rapidamente no citoplasma, e é transmitido para as células adjacentes através de vesículas de exocitose geradas na célula hospedeira<sup>(19)</sup>. Por meio desses processos, *A. actinomycetemcomitans* pode não só iludir as defesas do hospedeiro, mas também ter acesso aos tecidos periodontais subjacentes<sup>(37)</sup>.

A invasão de culturas primárias de células epiteliais gengivais por *P. gingivalis* é um processo activo e dependente de energia<sup>(37)</sup>. A internalização de *P. gingivalis* envolve uma via de endocitose mediada por receptor<sup>(19)</sup>. Os inibidores de protease podem inibir a invasão, sugerindo um papel para as proteases da *P. gingivalis* no processo de invasão<sup>(19)</sup>.

A formação do biofilme acontece sequencialmente<sup>(37)</sup>. Os microrganismos patogénicos produzem factores de virulência, estruturas, produtos ou estratégias para iludir o sistema de defesa do hospedeiro<sup>(38)</sup>.

Numa etapa inicial, ocorre a adesão dos colonizadores iniciais *Streptococci* e *Actinomyces spp* às glicoproteínas do hospedeiro, mucinas e outras proteínas de revestimento do dente (película aderida) por meio de adesinas que interagem com proteínas de membrana e/ou proteínas da matriz

extracelular para que ocorre a adesão<sup>(36)</sup>. Existem vários tipos de adesinas, produzidas de acordo com o tipo de bactéria e para a adesão inicial são importantes as proteínas da membrana externa e proteínas e enzimas da película aderida<sup>(38)</sup>.

As bactérias penetram nas células dos organismos por fagocitose mediada pelo sistema de defesa<sup>(39)</sup>. Nas células não fagocitárias, a endocitose é induzida pelas bactérias, com a participação de proteínas (invasinas) que podem estar presentes na membrana externa da bactéria<sup>(36)</sup>. As células dos hospedeiros podem responder de diversas formas à invasão<sup>(39)</sup>. Normalmente produzem citocinas e prostaglandinas, ou induzem a morte celular por necrose ou apoptose<sup>(19)</sup>.

Posteriormente, o desenvolvimento do biofilme é possibilitado através de fenómenos de coagregação e coadesão entre bactérias da mesma espécie ou entre espécies diferentes<sup>(34)</sup>. A bactéria *P. gingivalis* invade directamente as células epiteliais<sup>(39)</sup>. A sua adesão às células do hospedeiro é mediada por fimbriae (filamentos na superfície da bactéria), cuja interacção com as células da superfície do hospedeiro induz a internalização da bactéria e alteração das vias de sinalização do hospedeiro<sup>(39)</sup>.

Mais tarde, os colonizadores tardios, *Veillonellae sp.*, *Prevotella sp.*, e certos *Streptococci* efectuem também a adesão.<sup>(34)</sup> Uma bactéria importante que serve como “ponte” entre os colonizadores iniciais e os tardios é o *Fusobacterium nucleatum*<sup>(38)</sup>.

Por outro lado, foi demonstrado que um número específico de bactérias efectuem agregação entre si<sup>(38)</sup>. Por exemplo, *P. gingivalis* agrega-se com diversos *Streptococci* para colonizar<sup>(39)</sup>. Para além disso, as co-agregações de *P. gingivalis* aumentam a capacidade de cada organismo colonizar dentro de cada biofilme<sup>(39)</sup>. Alguns microrganismos demonstram um sinergismo aquando da colonização do biofilme<sup>(39)</sup>. Como por exemplo, *T. denticola*, na presença de *P. gingivalis* é incorporada no biofilme, o mesmo acontece com *T. forsythia* na presença de *F. nucleatum*<sup>(39)</sup>.

Posteriormente, ocorre então uma alteração da flora que era predominante por espécies bacterianas Gram + facultativas, para uma flora predominante por espécies Gram- anaeróbias<sup>(38)</sup>.

### 1.3.2 Factores bacterianos que regulam o início da infeção da doença periodontal

Os factores de virulência produzidos pelos microrganismos patogénicos, tais como citotoxinas, proteases e hemaglutininas, moléculas estruturais das bactérias, incluindo o lipopolissacáídeo (LPS) e o peptidoglicano (PGN), interagem com o sistema imunitário do hospedeiro<sup>(19)</sup>. A maioria destas moléculas, conservam padrões moleculares associados à patogénese (PAMPs) que são reconhecidos pelos receptores das células do hospedeiro, denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs)<sup>(34)</sup>. Os PRRs detectam PAMPs no ambiente e activam vias de sinalização específicas nas células do hospedeiro que iniciam os mecanismos moleculares da resposta inflamatória<sup>(11, 34)</sup>. Os factores de virulência bacteriana que incluem os PAMPs são: o LPS, peptidoglicano (PGN), ácido lipoteicóico (LTA), fímbrias, proteases, proteínas de choque térmico (HSPs) e *formil-metionil-leucil-fenilalanina* (fMLP) e diversas toxinas<sup>(15)</sup>. Os PRRs incluem os *receptores Toll-like* (TLR) e uma variedade de receptores acoplados à proteína G (GPCRs)<sup>(11)</sup>. Estudos demonstraram que *P. gingivalis* modula as funções de defesa imunitárias do hospedeiro através da alteração na secreção de IL-8, activação do complemento e activação de TLR4 (*receptor Toll-like 4*)<sup>(34)</sup>. Desta forma, impede que a defesa do hospedeiro exerça a sua actividade contra a comunidade microbiana oral, resultando numa alteração da composição da flora e consequente resposta inflamatória que contribuem para a patogénese da doença periodontal<sup>(39)</sup>.

### 1.4 Processos destrutivos na doença periodontal

Como resultado da infecção polimicrobiana, as bactérias actuam em conjunto de forma a fornecerem apoio nutricional e factores de agregação necessários para o desenvolvimento do biofilme<sup>(40)</sup>. Os microrganismos produzem uma grande variedade de enzimas solúveis que digerem as proteínas e outras moléculas do hospedeiro produzindo, deste modo, nutrientes



para o crescimento<sup>(9)</sup>. Eles também libertam muitos produtos metabólicos, como amónia, indol, sulfeto de hidrogénio e ácido butírico<sup>(13)</sup>. O efeito de muitos produtos estruturais, enzimáticos e residuais consiste em estimular, de maneira nociva, a produção de citocinas no hospedeiro<sup>(9)</sup>. As citocinas assim produzidas são predominantemente pró-inflamatórias e possuem múltiplos efeitos, servindo para intensificar a resposta inflamatória<sup>(13)</sup>. A destruição resultante é causada em grande parte por enzimas proteolíticas, conhecidas como proteases cuja actuação origina diversos polipéptidos que são utilizados para o crescimento de microrganismos<sup>(9)</sup>.

#### **1.4.1 Proteases e inibidores**

Aquando do início da reacção inflamatória, os neutrófilos, uma das primeiras células de defesa a alcançar a área inflamada, fundem o conteúdo dos seus lisossomas com a vesícula de fagocitose, permitindo assim que várias enzimas lisossomais, como a elastase, collagenase e catepsina G possam actuar sobre os microrganismos fagocitados<sup>(40)</sup>. Outras células também participam do dano tecidual do periodonto como fibroblastos ao libertarem substâncias ativadoras de proteases<sup>(41)</sup>.

Na doença periodontal o papel destrutivo desencadeado pelas proteases, tanto do hospedeiro quanto dos microrganismos, é decisivo para o processo degradativo<sup>(42)</sup>. As proteases são moléculas que clivam as proteínas através da hidrólise das ligações peptídicas<sup>(40)</sup>. Estas enzimas proteolíticas podem ser classificadas em dois tipos principais: endopeptidases (proteases) e exopeptidases, dependendo do local de corte promovido pela enzima<sup>(42)</sup>. As enzimas da primeira categoria cortam ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica, enquanto as exopeptidases clivam próximo dos terminais aminico ou carboxílico<sup>(41)</sup>.

As proteases libertadas em excesso no processo inflamatório são normalmente inactivadas por inibidores de proteases tais como: alfa-1-antitripsina (A1AT) e alfa-2-macroglobulina (A2MG)<sup>(40)</sup>. Contudo, durante a

periodontite, o equilíbrio entre proteases e seus inibidores sofre alteração, em função da excessiva libertação de proteases e inactivação por proteólise dos seus inibidores, geralmente conduzida por proteases microbianas<sup>(42)</sup>.

As metaloproteinases (MMPs) constituem uma família de enzimas proteolíticas (proteases), capazes de degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular, incluindo o colagénio, fibronectina, laminina e proteoglicanos<sup>(43)</sup>. Os neutrófilos expressam dois tipos de metaloproteinases: MMP-8 (*colagenase*), e MMP-9 (*gelatinase*)<sup>(44)</sup>. Estas enzimas podem ser libertadas em resposta a estímulos tóxicos, ou decorrentes da irritação num determinado local por substâncias ou subprodutos microbianos<sup>(44)</sup>. As metaloproteinases da matriz (MMPs), provenientes de células semelhantes aos neutrófilos e fibroblastos, são activadas no sulco gengival<sup>(43)</sup>. Os fragmentos de colagénio predominantes no sulco são resultantes da acção da protease do hospedeiro e não a microbiana, enfatizando a sobreposição da contribuição do hospedeiro para a actividade das proteases no sulco<sup>(40)</sup>.

A matriz extracelular corresponde ao complexo formado por moléculas de diferente natureza que são produzidas, exportadas e complexadas pelas células, modulando a estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos<sup>(45)</sup>. Encontra-se predominantemente no tecido conjuntivo, mas também nos demais tecidos e apresenta três componentes: componentes fibrilares (colagénios fibrilares e fibras elásticas); componentes não fibrilares (proteoglicanos e glicoproteínas não colagénicas) e microfibrilas (colagénio tipo VI, microfibrilas associadas à elastina)<sup>(46)</sup>.

A matriz do tecido conjuntivo é produzida inicialmente pelos fibroblastos, sendo essencial para a manutenção do tecido conjuntivo<sup>(45)</sup>. O transporte de água, electrólitos, nutrientes e metabólitos ocorre em direcção às células do tecido conjuntivo<sup>(45)</sup>.

Os proteoglicanos são macromoléculas de superfície da célula ou da matriz extracelular, nos quais uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos está ligada covalentemente a uma proteína de membrana ou a uma proteína secretada<sup>(47)</sup>. Estes representam o maior componente dos tecidos conjuntivos, e as suas interacções com proteínas, glicosaminoglicanos e outros proteoglicanos produzem rigidez e elasticidade<sup>(47)</sup>. As propriedades de

resistência e resiliência são obtidas através de interacções dos proteoglicanos com proteínas fibrosas da matriz (colagénio, elastina e fibronectina)<sup>(40)</sup>.

A *beta-glucuronidase* constitui uma das enzimas envolvidas na destruição dos componentes não colagénios da matriz extracelular<sup>(40)</sup>. É também considerada um indicador ou precursor da actividade da doença periodontal<sup>(40)</sup>.

Incluídas nas sete classes de enzimas proteolíticas secretadas por *P. gingivalis*, as proteases de cisteína denominadas *gingipains* prejudicam a função dos neutrófilos, manipulam a via do complemento, interferem com a coagulação, clivam imunoglobulinas, inactivam os inibidores de proteases endógenos e degradam proteínas da matriz extracelular e péptidos bioactivos<sup>(46)</sup>.

## 1.5 Osteoimunologia

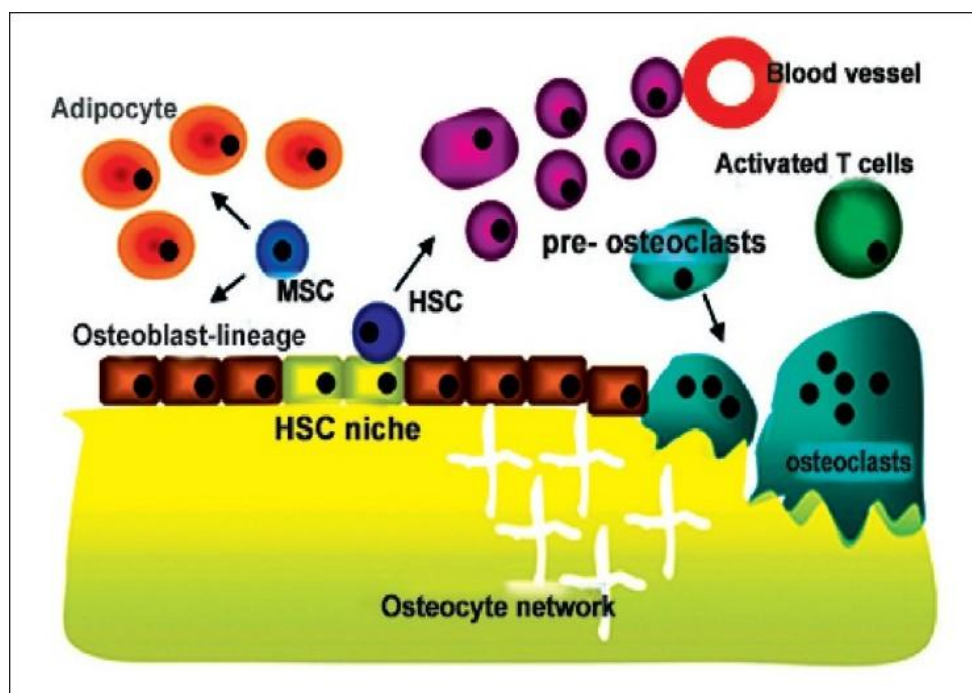
A Osteoimunologia é uma área emergente de pesquisa dedicada ao estudo dos processos imunológicos e a sua influência no tecido ósseo nas diversas doenças inflamatórias ósseas<sup>(48)</sup>. É importante para o estudo da doença periodontal, na medida em que os processos imunológicos, relacionados com os mecanismos de regulação dos osteoclastos e odontoblastos, permitem compreender as interacções que se produzem por contacto entre células ou pela secreção de mediadores imunoreguladores, como citocinas e quimiocinas através de células do sistema imunológico que são reguladas pelo complexo RANKL-RANK- OPG, permitindo compreender como se processa o início e desenvolvimento da doença periodontal<sup>(48)</sup>.

### 1.5.1 O osso e componentes imunológicos envolvidos

Um dos componentes imunológicos importantes para a resposta do hospedeiro a bactérias ou seus produtos consiste numa família de receptores designada *Toll like receptors* (TLRs)<sup>(48)</sup>. Os TLRs activam a resposta imunitária ao se ligarem a vários componentes microbianos<sup>(48)</sup>. Após a activação de TLR, uma cascata de sinalização intracelular activa vários factores de transcrição, como o NF-kB e AP-1, que vão estimular a síntese de citocinas pró-inflamatórias<sup>(48)</sup>. NF-kB é um factor de transcrição sensível a redox, que permanece no citoplasma das células ligado ao seu inibidor I-kB<sup>(48)</sup>. Quando esse complexo é fosforilado, o NF-kB é libertado do seu inibidor e é suficientemente pequeno para atravessar a membrana nuclear, ligar-se ao ADN, estimular a transcrição de citocinas pró-inflamatórias e subsequentemente produzir várias citocinas e quimiocinas e que originam posterior dano ósseo<sup>(48)</sup>.

Por outro lado, também é conhecido o papel dos adipócitos no sistema imunológico e no sistema esquelético<sup>(49)</sup>. Estas células libertam adipocinas como leptina, adiponectina, visfatina e resistina<sup>(50)</sup>. Os adipócitos também secretam IL-1 e TNF- $\alpha$  que são estímulos positivos para a expressão de leptina<sup>(50)</sup>. A leptina, um dos principais tipos de adipocinas, também é libertada por células do sistema imunológico e osteoblastos<sup>(50)</sup>. Ela regula o peso do corpo por meio da supressão do apetite e aumento de gastos de energia<sup>(50)</sup>. Na doença periodontal, ela estimula as células mononucleares do sangue periférico a secretar citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$  e ela própria actua como uma citocina pró-inflamatória em monócitos de activação, modulando a fagocitose de macrófagos e estimulando a produção de neutrófilos e de espécies de oxigénio reactivas envolvidas na resposta imune<sup>(51)</sup>. A leptina exerce dois mecanismos opostos no metabolismo ósseo: actua sobre os receptores ósseos que promovem o desenvolvimento de células osteoprogenitoras e estimula os osteoblastos a formar osso novo e actua através do sistema nervoso central, diminuindo a actividade dos osteoblastos<sup>(51)</sup>. Como podemos observar na figura 5, a leptina estimula a formação óssea, aumentando a proliferação dos osteoblastos humanos, a

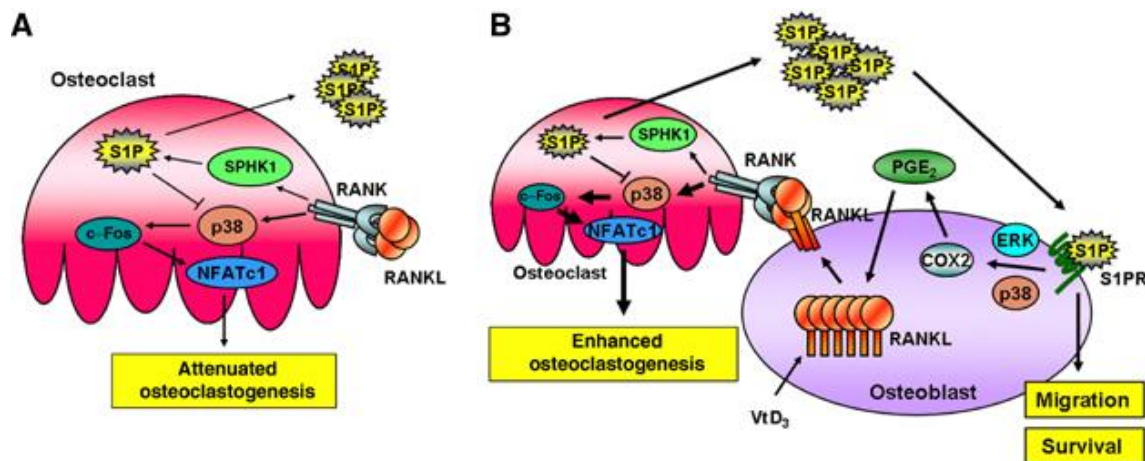
síntese de colagénio e a mineralização e favorecendo positivamente a relação OPG / RANKL através da regulação negativa de RANKL<sup>(49)</sup>. O regulador dominante dos adipócitos é designado *Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR  $\gamma$ ) que também é um regulador essencial no metabolismo da insulina<sup>(51)</sup>. Ácidos gordos insaturados, eicosanóides e os metabolitos de ácido linoleico activam PPAR -  $\gamma$  , que por sua vez diminui a regulação da secreção de citocinas, de quimiocinas e a expressão de moléculas co-estimuladoras, exercendo, assim, uma actividade anti-inflamatória<sup>(51)</sup>. Portanto PPAR-  $\gamma$  não só tem um efeito directo sobre os osteoclastos e a diferenciação dos osteoblastos, como age indirectamente sobre a remodelação óssea através da regulação da secreção de citocinas e quimiocinas<sup>(51)</sup>.



**Figura 5.** Regulação da secreção de citocinas por leptina<sup>(49)</sup>. A leptina estimula a formação óssea, ao estimular a proliferação dos osteoblastos humanos, a síntese de colagénio e a mineralização e, ao regular RANKL, favorece positivamente a relação OPG / RANKL<sup>(49)</sup>.

Relativamente à osteoclastogénese, esta é coordenada pela interacção de três membros da superfamília TNF (OPG/RANKL/RANK)<sup>(50)</sup>. A acção de RANKL na osteoclastogénese, já foi descrita anteriormente no capítulo 1.2.4.

A osteoclastogénese também é estimulada por S1P (esfingosina 1-fosfato), que consiste num metabolito esfingolípido bioactivo que regula diversas funções biológicas incluindo a proliferação celular, motilidade, e sobrevivência<sup>(52)</sup>. Imediatamente após a sua síntese, S1P livre é irreversivelmente degradado por S1P intracelular ou desfosforilada por fosfatases de S1P<sup>(52)</sup>. Como resultado, os níveis de S1P na maioria dos tecidos, incluindo a medula óssea, são relativamente baixos<sup>(52)</sup>. Em contraste, grandes quantidades de S1P são continuamente produzidas no plasma, especialmente por eritrócitos e a concentração sérica de S1P está extremamente elevada<sup>(52)</sup>. A S1P é produzida pela esfingosina-cinase (SPHK), uma cinase lipídica que fosforila esfingosina para gerar esfingosina 1-fosfato (S1P)<sup>(52)</sup>. Duas isoformas de mamífero de SHPK (SphK1 e SphK2) têm sido identificadas<sup>(52)</sup>. S1P também é produzido pela activação de SphK1 em resposta a RANKL<sup>(52)</sup>. Como se pode verificar na figura 6, após a ligação de RANK a RANKL, a osteoclastogénese é iniciada pela activação de sinais a jusante, como p38, c-Fos e NFATc1<sup>(52)</sup>. A S1P intracelular constitui um ciclo de feedback negativo na osteoclastogénese ao suprimir p38<sup>(52)</sup>. A S1P produzida em resposta a RANKL é exportada para o meio extracelular e liga-se a receptores de S1P em osteoblastos<sup>(52)</sup>. A interacção do receptor S1P-S1P estimula MAPKs a estimular COX-2 e PGE<sub>2</sub> em osteoblastos<sup>(52)</sup>. A seguir, a PGE<sub>2</sub>, estimula a expressão de RANKL, o que induz um aumento da osteoclastogénese, enquanto que a S1P extracelular estimula a migração e a sobrevivência de osteoblastos<sup>(50)</sup>. Nesta situação, SphK1 e S1P compreendem um ciclo de feedback positivo para a osteoclastogénese<sup>(52)</sup>.



**Figura 6.** Modulação da osteoclastogênese por SphK1 e S1P <sup>(52)</sup>.

A- feedback negativo (osteoclastogênese atenuada); B- feedback positivo (estimulação da osteoclastogênese) <sup>(52)</sup>.

## 1.6 Doença periodontal e diabetes - fisiopatologia

Existem evidências que sugerem uma forte relação entre a doença periodontal e a diabetes <sup>(53)</sup>. O elevado estado inflamatório na diabetes pode contribuir para ambas as complicações microvasculares e macrovasculares, e a hiperglicemia pode resultar na ativação de vias que aumentam a inflamação, o stress oxidativo e a apoptose <sup>(53)</sup>. A base bioquímica para o mecanismo de complicações da diabetes é a produção de produtos finais de glicação avançada (Advanced Glycation End-products - AGEs) <sup>(53)</sup>. Os AGEs são formados pela glicação não-enzimática de proteínas em condições de hiperglicemia prolongada <sup>(54)</sup>. O acúmulo dos AGEs aumenta a concentração de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina 1- $\beta$  (IL-  $\beta$ ) e o factor de necrose tumoral- $\alpha$ , que são antagonistas da insulina, além da prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), o que resulta na destruição do tecido conjuntivo <sup>(54)</sup>. A associação dos AGEs com os seus receptores (RAGEs) estimula a produção excessiva de interleucinas 1 e 6, factor de crescimento I, factor de necrose tumoral alfa,

prostaglandina e factor estimulador de colónias dos granulócitos<sup>(54)</sup>. Essas substâncias estimulam a transformação do colagénio em compostos menos solúveis, mais resistentes à acção de enzimas e menos flexíveis, o que contribui para a dificuldade de cicatrização encontrada nos pacientes diabéticos e activam osteoclastos e collagenases, conduzindo à destruição do osso e do tecido conjuntivo, aumentando a progressão e a severidade da doença periodontal<sup>(55)</sup>.

Simultaneamente, a infecção periodontal, condicionada por células fagocitárias e monócitos, pode induzir a um estado crónico de resistência à insulina, contribuindo para o ciclo da hiperglicemia<sup>(55)</sup>. O acúmulo dos AGEs aumenta a trilha clássica da destruição tecidual, agravando a doença periodontal e dificultando o controlo da glicemia do diabético<sup>(55)</sup>.

A figura 7 reúne as principais alterações da diabetes melitos associadas à doença periodontal.

### **1.6.1 Alterações dos neutrófilos**

Nos diabéticos, a actividade dos neutrófilos polimorfonucleares encontra-se modificada devido à diminuição da quimiotaxia, da aderência, da fagocitose e da destruição intracelular, o que diminui a capacidade imunológica e a resposta inflamatória desses pacientes<sup>(56)</sup>. Estas alterações são derivadas da hiperglicemia e acúmulo de AGEs, que activam continuamente PMNs e a libertação da mieloperoxidase, elastase e outros elementos dos grânulos neutrofílicos<sup>(56)</sup>.



### **1.6.2 Alterações teciduais**

Os pacientes diabéticos apresentam níveis séricos e salivares de interleucina-1 (IL-1), factor de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) mais elevados do que os pacientes saudáveis<sup>(56)</sup>. Em pacientes diabéticos, a cicatrização dos tecidos é prejudicada por alterações do tecido conjuntivo e vascular, que favorecem a doença periodontal<sup>(56)</sup>.

#### **1.6.2.1 Alterações do tecido conjuntivo**

O tecido conjuntivo do paciente diabético apresenta redução da função e do número de fibroblastos e menor síntese, maturação e estabilidade do colagénio<sup>(56)</sup>.

Os AEGs são responsáveis pela alteração de várias características funcionais de diversas moléculas da matriz extracelular<sup>(56)</sup>. O colagénio foi a primeira proteína na qual se observou a presença de ligações intermoleculares covalentes produzidas pelos AGEs<sup>(55)</sup>. A formação de AGEs no colagénio tipo IV na membrana basal dificulta a associação lateral dessas moléculas, causando aumento da permeabilidade, como por exemplo, no colagénio tipo I, a agregação molecular resultante induz distorção da estrutura molecular da fibrila<sup>(55)</sup>.

Por outro lado, o factor de crescimento de fibroblastos (FGF) tem a expressão do seu factor básico alterada nos pacientes diabéticos devido aos altos níveis de glicose, inibindo o crescimento das células do ligamento periodontal<sup>(55)</sup>. A fibronectina (sinalizador para as células do ligamento periodontal entre o meio intra e extracelular) sofre alterações devido aos elevados níveis de glicose, ocasionando mudanças morfológicas e a morte das células do ligamento<sup>(56)</sup>.

Além disso, ocorre diminuição da resposta quimiotática das células do ligamento periodontal do factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF),

que poderá ser um dos factores que leva à dificuldade de cicatrização em pacientes diabéticos e à causa da destruição mais grave na doença periodontal<sup>(56)</sup>.

Ainda, o aumento da profundidade do sulco gengival com formação de bolsas gengivais e a diminuição da pressão do oxigénio, contribui para a proliferação bacteriana, o que culmina no aumento da infecção e da inflamação<sup>(56)</sup>.

#### **1.6.2.2 Alterações microvasculares**

A hiperglicemia altera os processos metabólicos promovendo diversas alterações nos tecidos vasculares<sup>(55)</sup>. Dentro destas alterações destacam-se: a glicosilação das apoproteínas, a glicosilação do colagénio da parede dos vasos, o aumento da agregação plaquetária, o aumento da permeabilidade vascular, a alteração da actividade da proteína cinase e o acúmulo subendotelial de proteínas do plasma, como a albumina, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e imunoglobulina G (IgG)<sup>(55)</sup>. Essas alterações que ocorrem no tecido vascular do diabético alteram a difusão do oxigénio, o transporte de nutrientes, a migração de PMNs e monócitos/ macrófagos e a difusão de anticorpos, desencadeando desequilíbrio fisiológico que aumenta a susceptibilidade dos tecidos à doença periodontal<sup>(55)</sup>.

### **1.7 O papel dos AEGs na doença periodontal**

No paciente diabético, a glicose liga-se à parte final do radical amino das proteínas para formar uma base *Schiff* instável. Nas semanas que se seguem, essa base estabiliza e é designada *Amadori product*<sup>(55)</sup>. Na permanência de

hiperglicemia, esse *Amadori product* rearranja-se e torna-se um AGE irreversível como podemos verificar na figura 8<sup>(55)</sup>.

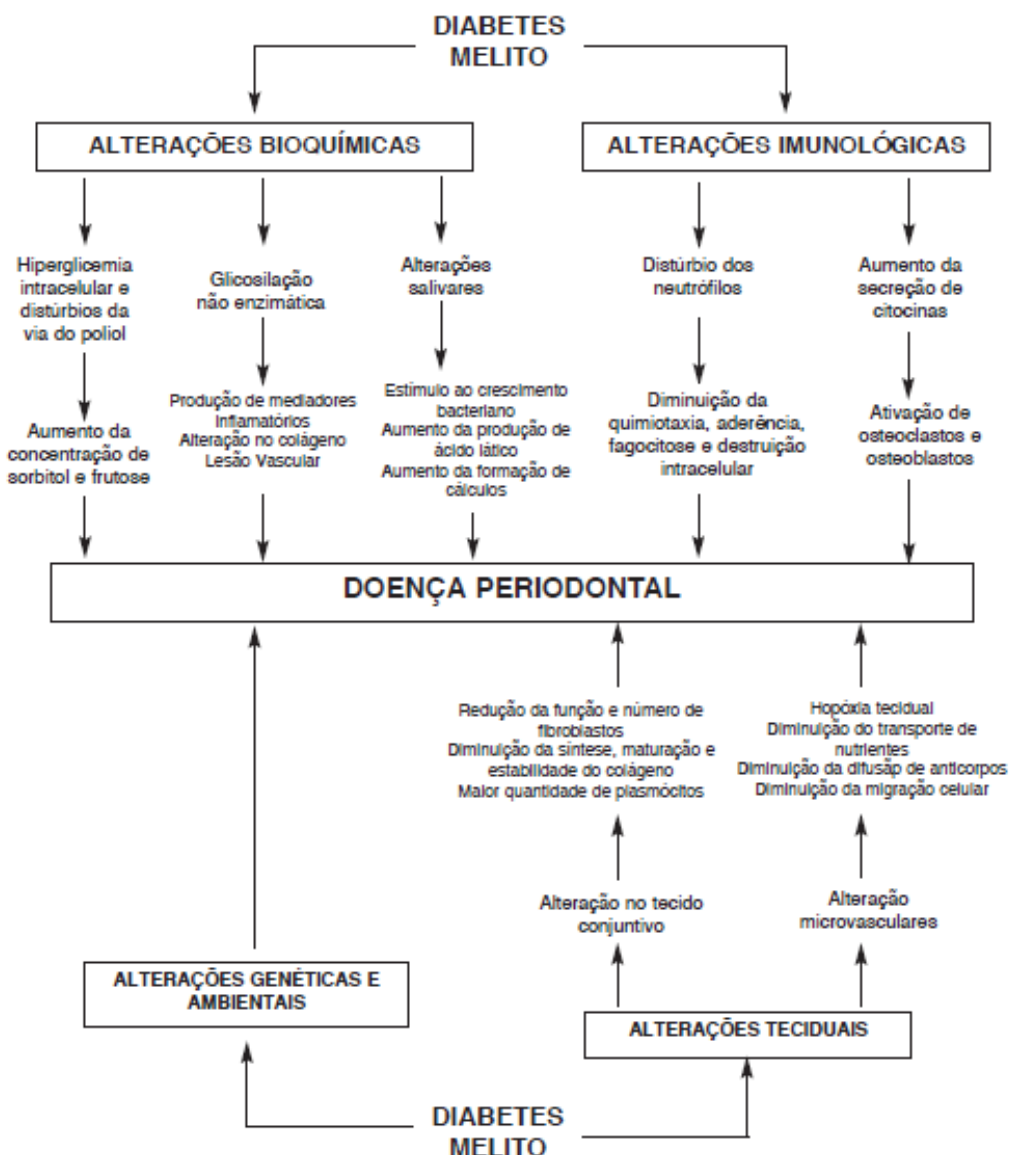
São três os mecanismos principais pelos quais os AGEs podem interferir na patogénese das complicações da diabetes<sup>(54)</sup>. Primeiro, os AGEs podem reagir com o colagénio da matriz extracelular formando uma reacção cruzada, resultando na formação de macromoléculas de colagénio altamente estáveis e que são resistentes à degradação enzimática e às modificações teciduais<sup>(55)</sup>. Esta reacção ocorre nas paredes tanto dos vasos maiores, favorecendo a formação de placas de ateromas, quanto dos vasos menores, alterando o transporte difusional normal através da membrana basal desses vasos<sup>(54)</sup>.

Outro processo decorrente da formação de AGEs é a sua ligação a receptores específicos membranares de diferentes tipos celulares, principalmente macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais. Esses receptores são conhecidos como RAGE (receptor de produtos finais de glicosilação avançada) e a sua expressão está aumentada nos indivíduos diabéticos<sup>(57)</sup>.

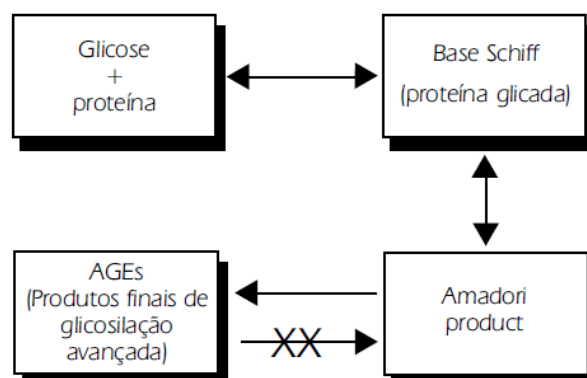
A interacção dos AGEs com RAGE nas superfícies celulares amplifica as suas respostas inflamatórias, como ocorre na doença periodontal e outras doenças crónicas<sup>(57)</sup>. Isso ocorre, porque células, como macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, quando activadas pelos AGEs, produzem maior quantidade de citocinas como IL-1 (interleucina 1), IL-6 (interleucina 6) e TNF- $\alpha$  (factor de necrose tumoral alfa), além de enzimas como as MMPs (metaloproteinases de matriz), responsáveis pela reabsorção óssea<sup>(57)</sup>. Os AGEs ao se ligarem ao receptor na célula, alteram o metabolismo celular, estimulando a libertação de radicais de oxigénio, designado stress oxidativo celular, responsável, por lesões vasculares e também pelo aumento da expressão da molécula de adesão celular VCAM-1, que possibilita a agregação de monócitos na parede endotelial e o aumento da formação de trombos e aterosclerose<sup>(57)</sup>.

O terceiro mecanismo acontece durante a formação de AGE no interior do citoplasma de algumas células<sup>(58)</sup>. A união dos hidratos de carbono às proteínas dentro das células pode alterar profundamente a função da proteína alvo, sendo muito deletéria em alguns casos na resposta imunoinflamatória<sup>(58)</sup>. Tem sido proposto que a interacção de AGEs com o receptor celular (RAGE)

resulta na perturbação das propriedades celulares, muitas das quais associadas ao desenvolvimento de doenças vasculares, bem como à sustentação do processo inflamatório observado em defeitos de cicatrização de feridas e doenças inflamatórias crónicas, como a doença periodontal avançada<sup>(57)</sup>. Nas células endoteliais, o aumento da interação AGE-RAGE resulta na hiperpermeabilidade vascular e aumento da expressão de moléculas de adesão pró-inflamatórias, como VCAM-1, que constitui um factor de risco para o desenvolvimento de doenças vasculares no diabético<sup>(57)</sup>. A interacção de AGEs com RAGE das células endoteliais poderia resultar, em parte, na perpetuação do processo inflamatório periodontal, devido ao aumento da expressão de VCAM-1, o que aumentaria a migração e a libertação dos monócitos para o periodonto<sup>(59)</sup>. Os macrófagos deslocam-se para locais onde há aumento de AGEs, e aí podem interagir com o AGE disponível, através do seu receptor (RAGE)<sup>(59)</sup>. Essa interacção provoca distúrbios intracelulares, levando a um aumento da libertação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-6 e TNF $\alpha$ ), além de alterar a capacidade dos macrófagos de realizar a renovação tecidual<sup>(57)</sup>.



**Figura 7.** Alterações na diabetes melitos associadas à doença periodontal <sup>(55)</sup>.



**Figura 8.** Formação dos AGEs <sup>(57)</sup>.

## 2. Objectivos

A importância do glico-OralOma, o qual integra o conjunto de proteínas glicosiladas existentes na cavidade oral: humanas e bacterianas, advém do facto de que a sua identificação e posterior estudo, permitirá elucidar as implicações decorrentes das modificações que algumas glicoproteínas humanas possam sofrer por acção microbiana ou por acção de outras proteínas e deste modo entender quais os mecanismos moleculares que se encontram disfuncionais e que contribuem para o início e progressão da doença periodontal. A alteração de modificações pós-tradução como a glicosilação/desglicosilação característica de uma determinada proteína, através da remoção ou adição de novos açúcares poderá contribuir para a alteração funcional das proteínas presentes na cavidade oral e constituírem também um factor implicado na doença periodontal <sup>(10)</sup>.

O presente trabalho pretende, após revisão da literatura, reunir e integrar os resultados dos diversos estudos de proteómica da cavidade oral referentes ao glico-Oraloma humano do paciente com gengivite ou periodontite, permitindo o seu estudo e, contribuindo através da análise interpretativa da informação para um melhor conhecimento dos mecanismos patogénicos envolvidos na gengivite e periodontite.

Deste modo, foram objectivos deste trabalho:

- ✓ Catalogar todas as proteínas humanas identificadas em estudos de proteómica na gengivite e na periodontite e actualizar a base de dados do OralOma;
- ✓ Anotar o Glico-OralOma humano da gengivite e da periodontite (crónica e agressiva) e analisar *in silico* os dados obtidos através de ferramentas bioinformáticas;
- ✓ Determinar os mecanismos moleculares em que participam as glicoproteínas implicadas na doença periodontal, responsáveis por modificar as vias de sinalização identificadas como comprometidas na gengivite e na periodontite, como contributo para o esclarecimento da desregulação dos processos de defesa do hospedeiro;

- ✓ Identificar as diferenças moleculares entre a gengivite, a periodontite crónica e a periodontite agressiva.

### 3. Materiais e Métodos

A pesquisa da bibliografia para este trabalho de investigação, foi dirigida no sentido de actualizar a informação relativa à doença periodontal disponível na ferramenta OralCard. O OralCard constitui uma ferramenta online, a qual integra o Oraloma, ou seja, o conjunto de proteínas identificadas na cavidade oral, humanas e bacterianas. Apesar de esta ferramenta possuir as proteínas identificadas na doença periodontal, como está em constante actualização da informação, neste estudo, foi efectuada uma nova pesquisa com o intuito de completar/adicionar novas proteínas/informação.

Assim, foi realizada com recurso à ferramenta Pubmed (Pubmed 2009), uma actualização dessa informação com base na pesquisa do proteoma salivar humano em pacientes com doença periodontal (gingivite ou periodontite crónica e agressiva), sendo a pesquisa limitada do ano 2006 até 2013. Para esta pesquisa utilizaram-se as palavras-chave “periodontitis biomarkers” OR “gingivitis biomarkers”. O resultado obtido foi de 652, 110, artigos respetivamente. No entanto, os artigos que foram admitidos para este estudo tiveram como base artigos que cumpriam critérios de inclusão. Assim foram considerados para este estudo todos os artigos que cumpriam os critérios seguintes: indivíduos saudáveis e com doença periodontal, independentemente da idade, raça ou sexo, fumadores e não fumadores, alcoólicos e não consumidores de álcool, que receberam ou não tratamento periodontal e indivíduos com e sem doenças sistémicas e grávidas. Critérios de exclusão: indivíduos com edentulismo total. Dos estudos encontrados, foram utilizados 27 estudos 11 estudos de proteómica, 16 estudos dirigidos, dos quais 2 referentes às proteínas identificadas em gingivite, 20 na periodontite crónica e 5 na periodontite agressiva.



### 3.1 Técnicas utilizadas

#### 3.1.1 Nos estudos de proteómica e não-proteómica

O objectivo principal dos estudos do proteoma consiste na avaliação da presença/ausência, quantidades e modificações pós-tradução de todas as proteínas presentes numa determinada amostra biológica (o proteoma). Para este estudo foram admitidos estudos de proteómica e estudos dirigidos. As técnicas utilizadas pelos estudos de proteómica incluíam: *fluorometric assay*, *chromatography*, *LC-MS/MS (mass spectrometry)* e softwares como *SPSS* e *ProteinLynx Global Server Version 2.3.5*.

As técnicas admitidas por estudos dirigidos compreendiam: a utilização de *PCR*, *immunoblotting* *ELISA*, *Western blot* e *immunometric assay kits*.

#### 3.1.2 Ferramentas informáticas

As ferramentas informáticas utilizadas permitem, catalogar e analisar a vasta informação experimental e bibliográfica sobre mecanismos moleculares envolvidos em várias doenças, incluindo na doença periodontal, e ainda identificar genes e proteínas, prever e comparar a estrutura de proteínas, identificar inibidores de enzimas, organizar e relacionar informação biológica, agrupar proteínas homólogas, entre outros inúmeros resultados.

Assim, as bioferramentas utilizadas neste estudo foram as seguintes:

- ✓ O OralCard consiste numa ferramenta bioinformática online (<http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/>), que permite a consulta da base de dados do OralOma, a qual contém toda a informação existente sobre todas as proteínas salivares identificadas até ao momento. Para cada proteína é apresentada a informação relativa ao local de produção da proteína, função, mecanismos moleculares e a sua associação a doenças. Neste trabalho, foi também utilizado o OralCard com o intuito

de recolher informação acerca da regulação proteica e respectiva quantificação, e posterior análise, o que permitiu a elaboração de vários gráficos.

- ✓ O programa VennPlex, foi utilizado para a elaboração de vários diagramas de Venn. Este software apresenta várias características, como importação e exportação de informação, facilita a análise de dois a 6 conjuntos, de qualquer comprimento, com a capacidade de relacionar as diversas polaridades numéricas de regulação de vários factores comuns entre as séries<sup>(60)</sup>.

Relativamente à análise funcional das proteínas salivares alteradas na gengivite e na periodontite, foram utilizadas as ferramentas bioinformáticas, PANTHER e UniProtKB<sup>(61,62)</sup>.

- ✓ Sistema de Classificação PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships): constitui um recurso único que classifica os genes pelas suas funções, utilizando a evidência experimental científica publicada e relações evolutivas para predizer funções apesar da ausência de evidência experimental direta. As proteínas são classificadas em: famílias e subfamílias de genes (incluindo árvores filogenéticas); classes ontológicas de genes (função molecular, processo biológico, componente celular); classes de proteínas e vias de sinalização incluindo diagramas. Para esta última ontologia, permite acesso a representações gráficas de mecanismos de interações funcionais já determinados. O PANTHER aplica anotação automática bem como revisão manual por especialistas da área e tratamento manual de informação para relações com a maior precisão possível, e para mantê-las actualizadas como novos resultados experimentais acumulados. Assim, com esta ferramenta podemos construir gráficos se pretendermos analisar um grupo de proteínas, relativamente às funções moleculares predominantes, vias de sinalização em que participam entre outras características<sup>(61)</sup>.

- ✓ O UniProtKB (UniProt Knowledgebase): é a base central para a colecção de informação funcional de proteínas, com anotação precisa, consistente e rica. Além de capturar a informação central obrigatória para cada entrada do UniProtKB (principalmente, a sequência de aminoácidos, nome da proteína ou descrição, dados taxonómicos e informações de citação), tem anotadas as informações complementares já disponíveis para essa proteína. Isto inclui ontologias biológicas largamente aceites, classificações e referências cruzadas, e indicações claras da qualidade de anotação na forma de atribuição de evidência de dados experimentais e computacionais. O UniProtKB consiste em duas secções: uma que contém os registos anotados manualmente com informação extraída da literatura e tratada por análise computacional, e uma secção com os registos analisados computacionalmente que aguardam uma anotação manual completa. Estas secções são referidas, respectivamente, como "UniProtKB / Swiss-Prot" (revisto, anotado manualmente) e "UniProtKB / TrEMBL" (sem estar revista, anotada automaticamente). Esta ferramenta também foi utilizada para verificar se cada proteína apresentava ou não modificação pós-tradução, o que permitiu a elaboração de diagramas com a catalogação das proteínas em glicosiladas e fosforiladas, de acordo com a proteína em questão<sup>(62)</sup>.

### **3.2 Anotação dos dados obtidos pela bibliografia**

Devido à vasta quantidade de informação, as proteínas identificadas nos estudos mencionados no item 3, foram catalogadas em diferentes categorias, o que permite uma melhor organização da informação e universalidade importantes para uma análise e comunicação corretas. Foram recolhidas as proteínas do Oraloma depositadas no Oralcard e as novas proteínas foram introduzidas segundo a tabela 1.

A tabela 1 seguinte apresenta os campos de informação anotada manualmente para todas as proteínas identificadas na doença periodontal, que foi introduzida no Microsoft Excell para ser analisada ao pormenor. Este método permite-nos ter uma grande quantidade de proteínas, todas dispostas segundo as suas características e um fácil acesso à informação.

Cada proteína é disposta em cada uma das colunas de informação pertencentes a várias categorias diferentes. As categorias abrangem vários tipos de informação sobre a proteína em questão, desde a identificação da proteína (correspondente ao número 1) que engloba o código UniprotKB, bem como o nome pelo qual está codificada a proteína. A proveniência da proteína em questão, está representada com o número 2, que integra a sua distribuição na cavidade oral (glândulas, saliva total, fluido crevicular, mucosa ou língua). A categoria correspondente ao número 3, é assinalada caso a proteína também esteja presente no indivíduo saudável e o número 4 refere o código da doença na qual foi identificada. O número 5 apresenta a quantificação da regulação da proteína, isto é, refere se é uma proteína que apresenta regulação alterada, relativamente ao Oraloma normal e o valor dessa alteração e a informação qualitativa do facto de esta se encontrar aumentada ou diminuída, relativamente ao seu valor normal está apresentada no número 11. O número 6 refere a caracterização da população estudada, isto é, a idade, o género e os hábitos sociais da amostra populacional e o número 7, refere os métodos de recolha da amostra de cada estudo utilizado, bem como os métodos de análise dos resultados e o tipo de estudo aplicado. O número 8 refere se a proteína em questão sofreu alguma modificação pós-tradução e o número 9 diz respeito ao facto da proteína ter sido ou não proposta como biomarcador no estudo que a identificou, sendo que este deverá ser citado na categoria com o número 10.

**Tabela 1.** Colunas de informação anotados manualmente para cada uma das proteínas identificadas. 1-identificação da proteína; 2-proveniência da proteína; 3- proteína presente em indivíduos saudáveis; 4- identificação da doença; 5-Regulação; 6- Caracterização da população estudada; 7- Metodologia do estudo; 8- proteína com modificações pós-transcricionais; 9-proteína identificada como biomarcador da patologia; 10 - Código NCBI do artigo, 11- Expressão.

UniProtKB AC 1	Name 1	Parotid 2	Parotid exosome 2	SM/SL 2	Minor 2
Whole Saliva 2	Crevicular fluid 2	Mucosa 2	Tongue 2	Health 3	Disease (OMIM ID or Disease Database) 4
Disease (MeSH ID) 4	Regulation 5	Age Group 6	Gender 6	Social Habits 6	Methods of sampling 7
Methods of analysis 7	Type of study 7	PTM 8	Biomarker 9	Citation (NCBI ID) 10	Expression 11

### 3.2.1 Cálculo da regulação da proteína

A quantificação da expressão das proteínas é importante para perceber, neste caso se a proteína se encontra alterada na doença periodontal e, por isso caso a sua regulação esteja muito aumentada ou diminuída, a possibilidade de esta apresentar processos disfuncionais relacionados com o início ou desenvolvimento da doença periodontal seria elevado. Assim, cada uma das proteínas identificadas nos estudos foi quantificada em pacientes com doença periodontal e no grupo controlo. De modo a quantificar a sua regulação,

recorreu-se ao cálculo de "fold change". Este cálculo permite obter a variação do valor de um controlo saudável em relação a um valor para um paciente com gengivite ou periodontite crónica ou agressiva. Quando o resultado do "fold change" é entre 0 e 1, utiliza-se o negativo do seu inverso ou seja:

Se o controlo for 40 e o paciente com gengivite ou periodontite tiver 10 o "fold change" será:

$10/40 = 0,25$  o inverso do negativo significa que:

$-(1/(10/40)) = -4$  ou seja, proteína é expressa 4 vezes menos na doença relativamente ao controlo saudável. Foi aplicado este sistema para todas as proteínas cujos estudos mencionavam valores de quantificação nos pacientes com doença periodontal e nos controlos.

### **3.3 Comparação entre o Oraloma da doença periodontal (gengivite, periodontite crónica e periodontite agressiva) e o total de anotações do Oralome**

A comparação entre todas as proteínas identificadas na cavidade oral até ao momento (Oraloma) e todas as proteínas das doenças periodontais, permite determinar os valores obtidos com valores expectáveis se se verificasse uma proporção directa relativamente ao total de proteínas anotadas no Oralome e entre os tipos de doença periodontal, com um intervalo de confiança específico. Esta comparação foi efectuada para a gengivite, para a periodontite crónica e para a periodontite agressiva.

Assim, para começar, anotaram-se os valores obtidos no PANTHER de cada item de cada ontologia em Microsoft Excel. Para cada um destes colocou-se o valor do total de anotações do Oralome e do verificado na gengivite, na periodontite agressiva e na periodontite crónica lado a lado. Por cálculo de proporção directa, foi inferido o valor que seria de esperar para cada item se houvesse proporção directa entre as entidades comparadas.

Para quantificar a diferença entre os valores observados e os valores esperados para cada item, calculou-se a diferença fraccional que consiste em:

$$DF = \left( \frac{Z_t - \hat{Z}_t}{\hat{Z}_t} \right)$$

$Z_t$  - representa o valor observado

$\hat{Z}_t$  - o valor esperado e DF a diferença fraccional.

A diferença fraccional é, então, o valor cuja multiplicação pelo valor esperado traduz quanto deveria ser adicionado ou subtraído ao valor observado para igualar o valor teoricamente esperado. Recorrendo a uma distribuição binomial para calcular a probabilidade de se observar um resultado muito agravado que contradiga o que se inferiu, calculou-se o *p-value*. Quanto menor o *p-value* menor a probabilidade do resultado apresentado ser devido à aleatoriedade. Um resultado é tanto mais significativo quanto menor for o seu *p-value*.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Actualização do Oraloma das doenças periodontais

A pesquisa efectuada sobre o proteoma salivar na gengivite e na periodontite (secção 3), permitiu actualizar a informação no OralCard. Foram utilizados 27 artigos <sup>(63,90)</sup> para a identificação das proteínas presentes na doença periodontal, dos quais 7 permitiram a identificação de 7 novas proteínas que foram adicionadas à base de dados do OralCard e estão representadas na tabela 2<sup>(63-68, 83)</sup>.

A actualização do Oraloma relativo à doença periodontal, o qual pode ser consultado pela ferramenta OralCard, coloca à disposição, um universo de 520 proteínas humanas identificadas no conjunto da gengivite, periodontite crónica e periodontite agressiva. Na gengivite foram identificadas 107 proteínas, na periodontite crónica 389 e na periodontite agressiva 129 proteínas.

Relativamente às 7 proteínas identificadas neste estudo, representadas na tabela 2: *E-selectin* (P16581), *Beta-glucuronidase* (P08236), *Cathepsin K* (P43235), *Cathepsin B* (P07858), *Oncostatin-M* (P13725), *Interferon gamma* (P01579) e *Osteopontin* (P10451), apresentam modificações pós-tradução, das quais 6 são glicosiladas e 1 também é fosforilada. As 7 proteínas mencionadas foram identificadas em indivíduos com doença periodontal crónica, excepto as proteínas *E-selectin* (P16581) e *Cathepsin K* (P43235) que foram também identificadas em indivíduos com periodontite agressiva. Não existindo dados quantitativos para a expressão das proteínas na doença periodontal, recorreu-se à utilização dos resultados qualitativos, sendo registado na tabela 2 se a expressão da proteína se encontrava aumentada ou diminuída relativamente aos valores de expressão num indivíduo saudável. A tabela 2 evidencia que todas as proteínas apresentam expressão aumentada, o que pode indicar que os mecanismos onde estas intervêm podem estar alterados. Segue-se uma breve descrição das propriedades funcionais de cada uma das novas proteínas identificadas nas doenças periodontais.



A proteína *E-selectin*, constitui uma molécula de adesão celular, expressa em células endoteliais activadas por citocinas, foi identificada em pacientes com periodontite crónica e agressiva<sup>(91)</sup>. A *oncostatin-M*, uma citocina associada à formação e à destruição óssea, foi sugerida como possível biomarcador da doença periodontal.<sup>(91)</sup> Através de uma pesquisa efectuada pela base de dados UniprotKB, verificámos que as funções moleculares que a *oncostatin-M* apresenta são: actividade de citocina; actividade de factor de crescimento e ligação do receptor de *oncostatin-M*<sup>(91)</sup>. É uma proteína que regula a produção de mediadores da inflamação como citocinas, incluindo IL-6, G-CSF e GM-CSF e, portanto uma modificação nesta proteína poderia alterar a resposta imunológica.<sup>(60)</sup> As *cathepsins K* e *B* constituem duas proteínas que participam no processamento de antigénios.<sup>(60)</sup> A *osteopontin* é uma proteína com actividade de citocina, que participa na resposta do sistema imune, bem como na adesão celular.<sup>(92)</sup> Por último, a *beta-glucuronidase* é uma proteína envolvida no processo metabólico dos hidratos de carbono.<sup>(93)</sup>

<p><b>Tabela 2.</b> Catalogação das proteínas identificadas neste trabalho relativas à doença periodontal e depositadas na base de dados do OralCard.</p>
---

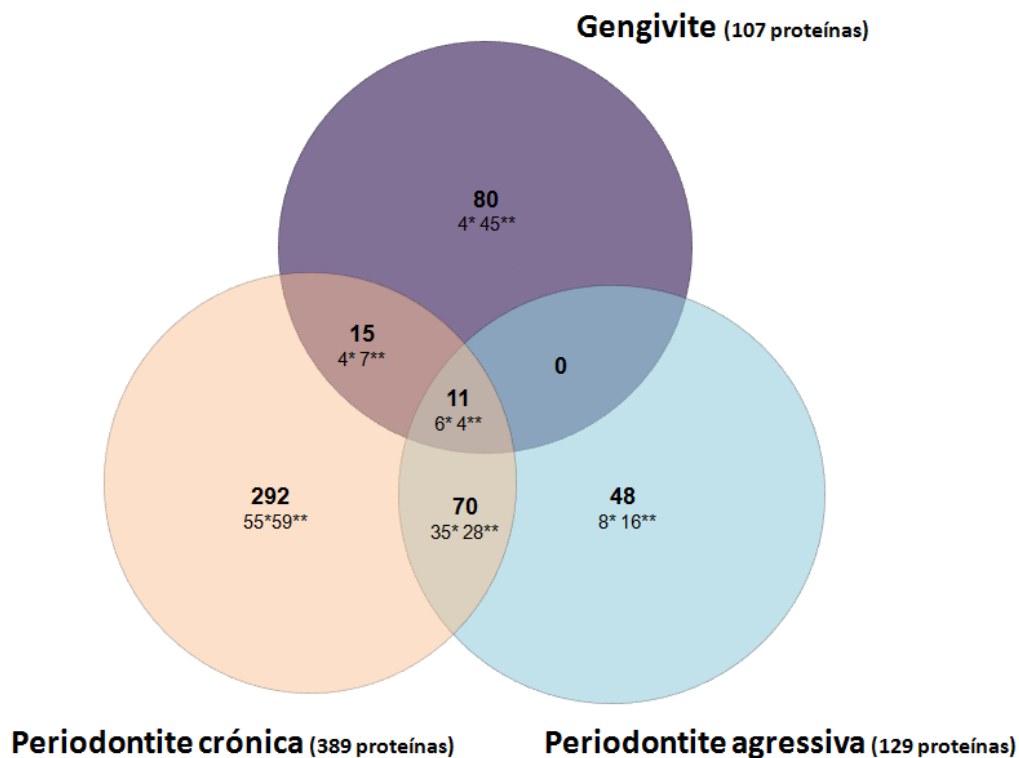
Código Uniprot	Nome da proteína	Gengivite	Periodontite crônica	Periodontite agressiva	Glicosiladas	Fosforiladas	Glicosiladas e fosforiladas	Expressão	Citação (NCBI ID)
P16581	E-selectin		X	X	X			Aumentada	18973547
P08236	Beta-glucuronidase		X		X			Aumentada	16911568
P43235	Cathepsin K		X	X	X			Aumentada	22010081
P07858	Cathepsin B		X		X			Aumentada	16953825
P13725	Oncostatin-M		X		X			Aumentada	21404969
P01579	Interferon gamma		X		X			Aumentada	20958339
P10451	Osteopontin		X				X	Aumentada	23162328

## 4.2 Proteoma da doença periodontal

O gráfico da figura 9, reúne as 513 proteínas já depositadas no OralCard, às quais foram adicionadas as 7 proteínas identificadas pelo presente estudo, perfazendo um total de 520 proteínas.

O número de proteínas a negrito corresponde ao total das proteínas identificadas na gengivite, na periodontite agressiva e na periodontite crónica. O número de proteínas que apresentam modificação pós-tradução foram representadas no gráfico da figura 9, sendo as proteínas glicosiladas identificadas com (\*) e as fosforiladas com (\*\*) (ver secção materiais e métodos).

Através da análise do gráfico da figura 9 podemos verificar que existem proteínas exclusivas de cada patologia e 11 proteínas comuns às três doenças. A periodontite crónica e a gengivite partilham 15 proteínas, enquanto a periodontite crónica e agressiva partilham 70 proteínas. Não existem proteínas comuns à gengivite e à periodontite agressiva e o maior número de proteínas glicosiladas (55 proteínas) e fosforiladas (59 proteínas) é observado na periodontite crónica, que constitui a doença com maior número de proteínas identificadas até ao momento (389 no total).

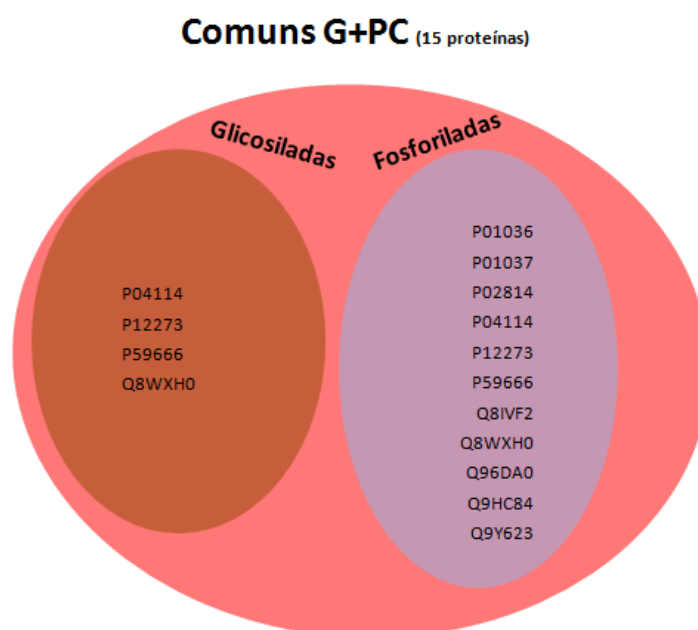


**Figura 9.** Diagrama representativo do número de proteínas identificadas como estando presentes na gengivite, na periodontite crónica e na periodontite agressiva, de acordo com a informação depositada no OralCard. As proteínas foram ainda catalogadas em glicosiladas(\*) e fosforiladas (\*\*) e verificou-se que o maior número de proteínas identificadas ocorre na periodontite crónica (389).

#### 4.2.1 Proteoma comum à gengivite e à periodontite crónica – identificação do glico-oraloma e do fosfoproteoma

A identificação do universo das proteínas glicosiladas e fosforiladas comuns na doença periodontal poderá elucidar os principais mecanismos que se encontram alterados e que originam ou permitem a evolução da doença periodontal. Nesse sentido, esta secção destina-se à apresentação dos resultados da identificação e estudo das proteínas comuns à gengivite e à

periodontite crónica e estas encontram-se representadas no gráfico da figura 10, o qual evidencia as modificações pós-tradução de cada uma dessas proteínas e que inclui 16 proteínas (figura 10). De acordo com o gráfico da figura 10, concluiu-se que as proteínas comuns à gengivite e à periodontite crónica incluem 68,75%, que correspondem a proteínas fosforiladas, enquanto que as proteínas glicosiladas são 31,25%.



**Figura 10.** Diagrama representativo do total das proteínas comuns à gengivite e periodontite crónica e que se encontram depositadas no OralCard. As proteínas foram ainda catalogadas em glicosiladas e fosforiladas e verificou-se que o maior número de proteínas identificadas são proteínas fosforiladas (11 no total). G-gengivite; PC-periodontite crónica.  
O nome das proteínas pode ser consultado na secção anexos.

Durante o processo inflamatório, a acção quimiotática e de adesão dos neutrófilos pode ser mediada por proteínas como *Calprotectin L1H subunit* (P06702), uma proteína fosforilada identificada no Oraloma da doença periodontal, como estando presente na gengivite, na periodontite crónica e na periodontite agressiva<sup>(94)</sup>. A regulação aumentada verificada em cada uma

dessas patologias é coerente com o facto da proteína *Calprotectin L1H subunit* apresentar função de receptor de ligação e participar em processos de *cell communication* e *immune system process*, ao estimular a adesão dos neutrófilos ao fibrinogénio e ao activar a integrina  $\beta_2$  Mac-1 (CD11b/CD18), possibilitando a adesão promovida pela interação com as células endoteliais via Mac-1/ICAM-1<sup>(94)</sup>.

Posteriormente, a acção dos neutrófilos no processo inflamatório, estimula a libertação dos seus constituintes durante a fagocitose<sup>(95)</sup>. Dos principais constituintes enzimáticos dos neutrófilos, a lactotransferina (P02788) e a elastase (P08246), constituem duas proteínas identificadas no Oraloma da doença periodontal, que intervêm no processo inflamatório e quando libertadas em excesso causam destruição tecidual<sup>(95)</sup>. No Oraloma estas proteínas encontram-se identificadas em indivíduos com periodontite crónica e agressiva, apesar do seu inibidor alfa-2-macroglobulin (P01023), uma glicoproteína, se encontrar representado na gengivite e na periodontite crónica (figura 10). Sabe-se que este consiste num dos principais inibidores de proteases, o qual apresenta função molecular de actividade de citocina, ao controlar a sobrevivência e a função dos tecidos e células e também, ao inibir a actividade de endopeptidases tipo serina, participando em processos biológicos de *cell communication* e *response to stimulus*. A sua quantidade de expressão está aumentada na periodontite crónica, o que pode indicar que nessa altura o processo inflamatório já está instaurado<sup>(96)</sup>. Os neutrófilos humanos são ainda constituídos por proteínas antimicrobianas que participam na resposta inata e que contribuem para o balanço entre a saúde e a doença, como as proteínas *neutrophil defensin*, sendo que a *neutrophil defensin 3* foi identificada no Oraloma da doença periodontal, na gengivite e na periodontite crónica, com regulação diminuída nesta última, o que poderá estar relacionado com a evolução para periodontite crónica.

Na figura 10, ao conjunto das proteínas fosforiladas, pertencem as proteínas inibidoras de proteases como *Cystatin-SN* (P01037), uma proteína membranar dos queratinócitos que apresenta funções de *binding* e *enzyme regulator activity* e proteínas estruturais e residuais como a proteína *Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B* (P02814), com função desconhecida. A proteína *Cystatin-SN* (P01037) é responsável por inibir

proteases de cisteína, ou seja, enzimas que clivam ligações peptídicas e que quando libertadas em excesso causam destruição tecidual, o que contribui para a resposta imunológica verificada inicialmente na gengivite e participa em processos biológicos de *metabolic process*.

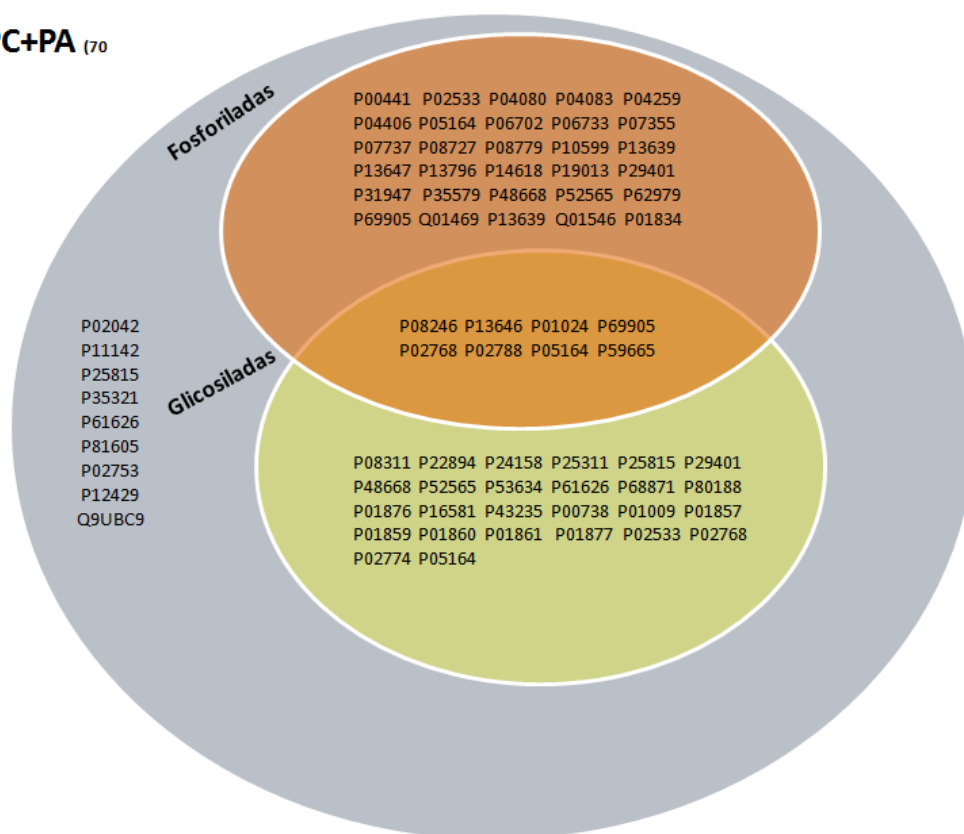
Relativamente às proteínas glicosiladas, elas são essencialmente estruturais. A proteína *Nesprin-2* (Q8WXH0), é uma proteína constituinte do citoesqueleto e apresenta função de ligação de cálcio e processos de *cell communication*, a proteína *apolipoprotein B-100* (P04114) constitui uma proteína implicada no metabolismo dos lípidos bem como a proteína *Prolactin-inducibile protein* (P12273). As restantes não estão classificadas na ferramenta *Panther*.

#### **4.2.2 O proteoma comum à periodontite crónica e agressiva - identificação do glico-oraloma e do fosfoproteoma**

Com o intuito de podermos identificar os mecanismos comuns à periodontite crónica e agressiva responsáveis pelo agravamento da doença periodontal, as proteínas comuns a estas duas doenças foram agrupadas no gráfico da figura 11, de forma a encontrarmos quais as proteínas que se encontram alteradas.

O gráfico da figura 11 apresenta as 70 proteínas comuns à periodontite crónica e agressiva e identifica as proteínas glicosiladas e fosforiladas. As proteínas glicosiladas correspondem a 42,85% enquanto existem 37,14% de proteínas fosforiladas, bem como 11,42 % que apresentam ambos os mecanismos de pós-tradução e 12,86 % que não apresentam modificação pós-tradução.

**Comuns PC+PA** (70  
proteínas)



**Figura 11.** Gráfico que representa as proteínas comuns à periodontite crónica e agressiva e proteínas que apresentam modificação pós-tradução. As proteínas glicosiladas e fosforiladas foram agrupadas em dois grupos distintos, embora existam 8 proteínas que apresentam ambas as modificações. As restantes proteínas que não estão em nenhum dos grupos (9 no total), representam proteínas que não sofreram nenhuma modificação pós-tradução.

Foram identificadas várias citocinas que se encontram no Oraloma da doença periodontal, entre elas, a IL-1 $\beta$  (P01584) é produzida por macrófagos activos, e é responsável por qual estimular a libertação de prostaglandina e colagenase das células sinoviais<sup>(97)</sup>. Esta citocina encontra-se no Oraloma na periodontite crónica, mas não apresenta regulação<sup>(97)</sup>. IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória importante que medeia a degradação de proteínas da matriz extracelular através de um aumento da expressão das metaloproteinases da matriz<sup>(97)</sup>.



A IL-6 (P05231), por sua vez, consiste numa proteína presente na periodontite crónica, com regulação aumentada<sup>(98)</sup>. Esta estimula a indução de células Th 17 que produzem IL-17, responsável pela indução da expressão de RANKL nos osteoblastos e aumenta a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos<sup>(98)</sup>. Os níveis elevados de IL-6 vão induzir a reabsorção óssea, através da activação dos osteoclastos<sup>(98)</sup>. Consequentemente, a dificuldade em resolver a inflamação característica da doença periodontal, consiste na dificuldade em retornar à homeostasia relacionada com a sobre-expressão de IL-6<sup>(98)</sup>.

As principais proteases libertadas por neutrófilos: a lactotransferina (P02788) e a elastase (P08246) foram ambas identificadas na periodontite crónica e agressiva e estão representadas na figura 11. A lactotransferina, constitui uma glicoproteína globular, que desempenha um papel protector na inflamação devido à sua capacidade antioxidante, acção citotóxica directa e inibição da formação do biofilme oral<sup>(99)</sup>. Apesar de não ser uma proteína exclusiva da doença periodontal, a lactotransferina, foi identificada na periodontite crónica e na periodontite agressiva<sup>(99)</sup>. A sua regulação revela-se aumentada na periodontite crónica, contrariamente à periodontite agressiva onde pode estar aumentada (no fluido crevicular) ou diminuída (na saliva). A lactotransferina apresenta efeito bactericida contra alguns microrganismos e pode modular a agregação e desenvolvimento do biofilme, ao inibir a adesão de *S. mutans*<sup>(99)</sup>. Embora apresente propriedades antibacterianas, a expressão elevada na periodontite crónica e agressiva, ambas no fluido crevicular pode estar relacionada com uma tentativa de controlar o processo da doença<sup>(99)</sup>. No entanto, a diminuição na periodontite agressiva, na saliva, não reflecte a avaliação da função de uma glândula em especial, mas representa uma mistura das secreções das glândulas salivares acrescidas de substâncias oriundas do fluido crevicular gengival, células epiteliais descamadas, microorganismos e os produtos de seus metabolismos e poderá ser indicador de uma fase mais estável da acção desta enzima, em que já não é possível retornar ao estado de homeostase. Relativamente à elastase (P08246), esta constitui uma protease, que foi identificada no Oraloma da doença periodontal em termos de regulação, como aumentada, quer na periodontite crónica, quer na periodontite agressiva. A elastase que pode estar envolvida na regulação da

inflamação crónica, constitui uma serina protease neutra que pode degradar um número de proteínas importantes na matriz extracelular, tais como a elastina, fibronectina e colagénio dos tipos I, II, III e IV<sup>(100)</sup>. Além disso, inibe a estimulação de neutrófilos e é responsável pela quebra de citocinas, bem como contribui para a diminuição da capacidade dos neutrófilos para eliminar bactérias por fagocitose ao clivar a imunoglobulina A e G, o componente do sistema de complemento C3bi e o receptor de neutrófilos CR1 envolvidos na fagocitose<sup>(100)</sup>. A sua regulação aumentada em ambas as patologias pode sugerir que não é possível regressar ao estado de homeostasia e que a inflamação é irreversível.

Além das proteases referidas anteriormente os neutrófilos também podem secretar outro tipo de enzimas como *cathepsin G*, proteinase 3, MMP-8 e MMP-9<sup>(101)</sup>. A *cathepsin G* está presente quer na periodontite crónica quer na agressiva, apresentando regulação aumentada em ambas, e é responsável por estimular a quimiotaxia e a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos<sup>(101)</sup>. A regulação aumentada de *cathepsin G* vai estimular a produção de citocinas como IL-1 (P18510), que é um importante modulador da matriz extracelular e da reabsorção óssea, contribuindo para o agravamento da doença periodontal<sup>(102)</sup>. A IL-1 encontra-se identificada no Oraloma apenas na periodontite crónica e a sua regulação está aumentada no fluido crevicular e diminuída na saliva, o que poderá indicar que, na periodontite crónica, após o processo inflamatório inicial, e constituindo uma molécula de adesão celular, esta atingiu uma fase na qual não é possível retornar ao estado inicial de homeostase, o que pode ser traduzido pela diminuição desta proteína na saliva que contém secreções de várias glândulas, bem como do fluido crevicular gengival.

A *cathepsin K* (P43235) constitui outra protease que está presente quer na periodontite crónica quer na agressiva no Oraloma e apresenta regulação aumentada em ambas. É estimulada por citocinas e é responsável pela degradação do colagénio durante a reabsorção óssea<sup>(103)</sup>. A sua eliminação estimula a formação óssea mediada por S1P, sugerindo que uma vez que está aumentada, nesse caso, poderá ocorrer maior reabsorção óssea e assim contribuir para a evolução da doença periodontal<sup>(103)</sup>.

Por outro lado, a proteína alfa-1-antitripsina (P01009) constitui um inibidor de proteases identificado na periodontite crónica e agressiva, com regulação aumentada na periodontite crónica e diminuída na periodontite agressiva. O seu papel parece resumir-se à defesa antimicrobiana, uma vez que a sua regulação aumentada na periodontite crónica pode constituir uma tentativa de retorno para a homeostasia inicial e a sua diminuição na periodontite agressiva, pode indicar que a reabsorção óssea é iminente e não é possível regressar ao estado inicial. Apresenta função molecular de citocina e participa em processos biológicos de *cell communication*, *immune system* e *response to stimulus*.

A *neutrophil-collagenase* (P22894), uma glicoproteína produzida por macrófagos, é uma proteína comum à periodontite crónica e agressiva e é uma enzima responsável pela degradação de colagénio<sup>(104)</sup>. A sua regulação aumentada em ambas as doenças, indica que a destruição de colagénio se verifica em ambos os estados e sugere a gravidade da doença.

As restantes proteínas apresentadas no gráfico da figura 11, do grupo das glicoproteínas, são sobretudo da família da queratina, proteínas transportadoras de lípidos, moléculas estruturais, hidrolases, oxidoreductases e proteínas transportadoras. Apresentam maioritariamente a função molecular de *citokine*, *small GTPase regulator activity*, *calcium binding*, *isomerase activity* e *serine-type peptidase activity* e são interessantes do ponto de vista biológico ao estarem envolvidas em processos de *cell communication* (proteína *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (P80188); proteína *C3a anaphylatoxin* (P01024), proteína *Rho GDP-dissociation inhibitor 1* (P52565), *Protein S100-P* (P25815) e *E-selectin* (P16581); processos de *immune system* e *response to stimulus* (proteína *Zinc-alpha-2-glycoprotein* (P25311), *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (P80188), *C3a anaphylatoxin* (P01024), *84 kDa myeloperoxidase* (P05164), *cathepsin G* (P08311), *Cathepsin K* (P43235), *Haptoglobin* (P00738), *Neutrophil elastase* (P08246), *Dipeptidyl peptidase 1* (P53634), *Lysozyme C* (P61626), *Protein S100-P* (P25815), *E-selectin* (P16581), *Myeloblastin* (P24158), *Alpha-1-acid glycoprotein 1* (P02763)) e ainda processos de *response to stimulus* (proteína *Zinc-alpha-2-glycoprotein* (P25311), *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (P80188), *C3a anaphylatoxin* (P01024), *84 kDa myeloperoxidase* (P05164), *cathepsin G* (P08311), *Cathepsin K* (P43235),

*Haptoglobin* (P00738), *Neutrophil elastase* (p08246), *peptidase 1* (P53634), *Lysozyme C* (P61626), *E-selectin* (P16581) e *Myeloblastin* (P24158) (figura 11).

Relativamente às proteínas fosforiladas, as proteínas comuns à periodontite crónica e à periodontite agressiva, na sua maioria são sobretudo proteínas da família da queratina, proteínas transportadoras de lípidos, moléculas estruturais, proteínas que ligam cálcio, oxidoreductases e proteínas reguladoras da atividade GTP. Apresentam função de *calcium binding*, *oxidoreductase activity* ou possuem *GTPase regulator activity* e participam em processos de *cell communication* (*Fatty acid-binding protein*, *epidermal* (Q01469), *Rho GDP-dissociation inhibitor 1* (P52565), *Thioredoxin* (P10599), *14-3-3 protein sigma* (P31947), *Annexin A1* (P04083), *Annexin A2* (P07355), *Myosin-9* (P35579), *immune system process* (*Protein S100-A9* (p06702) e *Thioredoxin* (P10599)) e *response to stimulus* (*Thioredoxin* (P10599)) (figura 11).

As restantes proteínas apresentam outras modificações pós-tradução. A proteína *Annexin A3* (P12429) apresenta função de *calcium ion binding* e *calcium-dependent phospholipid binding* e a proteína *S100-P* (P25815) apresenta função de *calcium ion binding*, *receptor binding* e *calmodulin binding*. Ambas participam em processos biológicos de *cell communication* e a proteína *S100-P* (P25815) também participa em processos de *immune system*.

#### **4.2.3 O proteoma comum à gengivite, à periodontite crónica e à periodontite agressiva - identificação do glico-oraloma e do fosfoproteoma**

Por forma a podermos identificar um mecanismo comum à gengivite, à periodontite crónica e agressiva, que explique, a origem ou evolução da doença, as proteínas comuns a estas doenças foram agrupadas no gráfico da figura 12, de forma a encontrarmos quais as proteínas que se encontram alteradas nestas doenças. O gráfico da figura 12 apresenta as 11 proteínas comuns à gengivite, à periodontite crónica e agressiva e identifica as proteínas

glicosiladas e fosforiladas. As proteínas glicosiladas correspondem a 36,36% enquanto existem 54,54% de proteínas fosforiladas.

### Comuns G+PC+PA

(11proteínas)



**Figura 12.** Diagrama representativo das proteínas comuns à gengivite, à periodontite crônica e à periodontite agressiva, que se encontram depositadas no OralCard. As proteínas que apresentam modificação pós-tradução foram agrupadas em fosforiladas e glicosiladas, com excepção da proteína P35527 que não apresenta modificação pós-tradução. O nome das proteínas pode ser consultado na secção anexos.

Relativamente às proteínas fosforiladas, elas são essencialmente proteínas pertencentes à família da queratina e apresentam função molecular de *binding* e *structural molecule activity* e intervêm em processos biológicos de *cellular componente organization*, *celular process*, e *developmental process*.

Relativamente às proteínas glicosiladas, elas são essencialmente proteínas relacionadas com o metabolismo do glicogénio (*alpha-amylase*, P04745), proteínas transportadoras (*Serotransferrin*, P02787), proteínas envolvidas na manutenção do pH na superfície dentária (*carbonic anhydrase 6*, P23280) e uma porção de uma imunoglobulina (*Ig alpha-1 chain C region*, P01876). Relativamente às funções moleculares elas apresentam função de hidrolase, excepto a proteína (*carbonic anhydrase 6*, P23280) que apresenta

função de liase. Em relação aos processos biológicos, elas participam em processos metabólicos exceto a proteína *Serotransferrin* (P02787), que constitui uma proteína transportadora.

### **4.3 Identificação das proteínas quantificadas e exclusivas da doença periodontal**

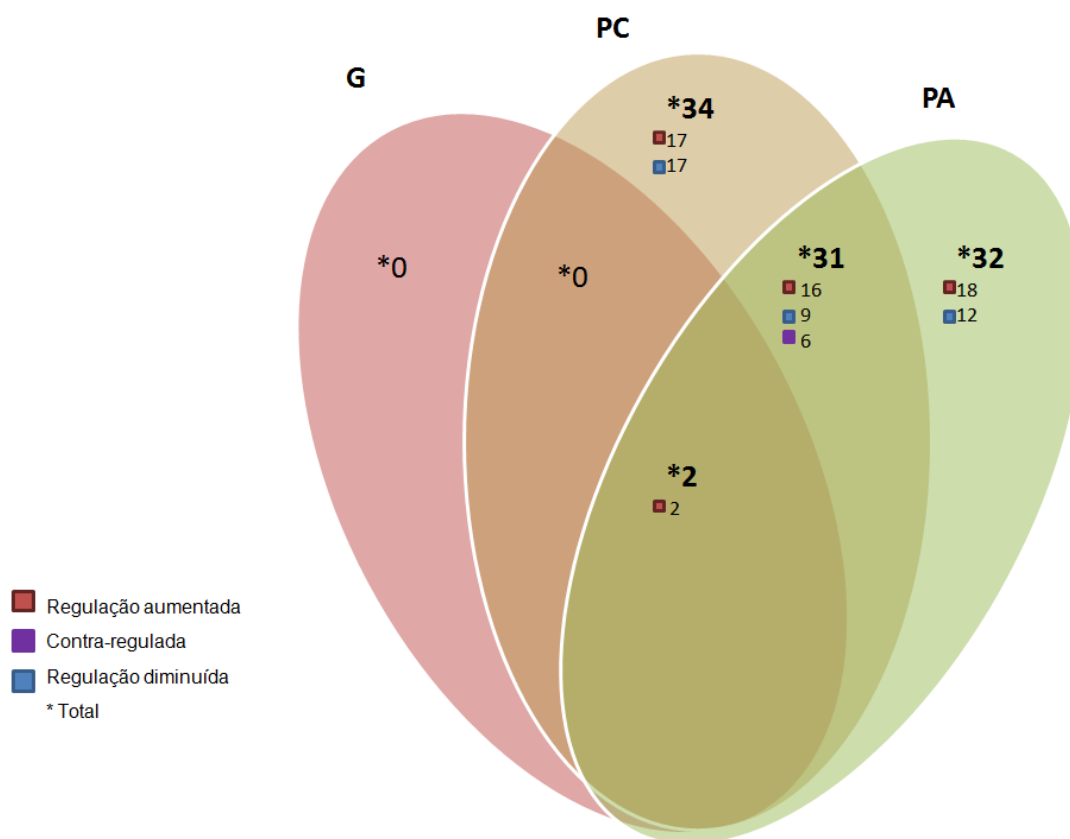
Com o objectivo de verificar quais os mecanismos que são exclusivos da doença periodontal, na presente secção, foram reunidas as proteínas apenas identificadas em indivíduos que apresentam esta doença e estas foram posteriormente quantificadas em termos de regulação.

#### **4.3. 1 Proteínas quantificadas**

A alteração da quantidade de expressão de uma proteína, ou seja se ela se encontra aumentada ou diminuída relativamente ao Oraloma normal, pode ser o resultado de processos de inibição ou de activação, induzidos por proteínas com as quais interagem.

O gráfico da figura 13 apresenta a distribuição das proteínas identificadas na doença periodontal pelas várias patologias, em termos de quantificação da sua expressão (ver secção materiais e métodos). Podemos verificar que na gengivite não existem proteínas com dados de quantificação, e apenas existem 2 proteínas comuns a todas as doenças que foram quantificadas. Nas restantes patologias, é de destacar na periodontite crónica, o facto de o mesmo número de proteínas, 17, apresentarem expressão aumentada ou expressão diminuída relativamente ao Oraloma normal. Na periodontite agressiva, existe um maior número de proteínas com regulação aumentada (18 proteínas), relativamente às com regulação diminuída e nas proteínas comuns às duas patologias e, verifica-se, um maior número de proteínas com regulação aumentada, em ambas as doenças com 16 proteínas

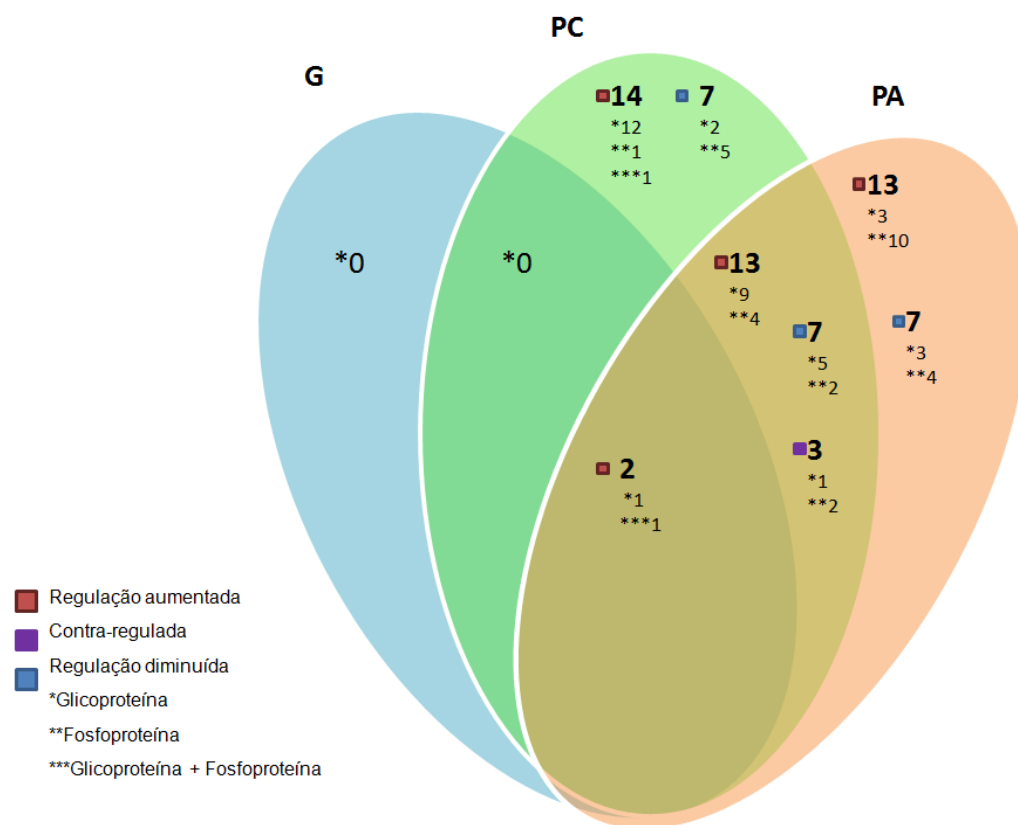
na totalidade. Relativamente às proteínas contra-reguladas, existem 9 proteínas identificadas quantificáveis em ambas as doenças, na periodontite crónica e agressiva que estão contra-reguladas. Trata-se das proteínas *Keratin, type II cytoskeletal 1* (P04264), *Keratin, type II cytoskeletal 5* (P13647), *Transketolase* (P29401), *Keratin, type I cytoskeletal 9* (P35527), *Zinc-alpha-2-glycoprotein* (P25311), *Dermcidin* (P81605), *Cytotoxin 2* (P01469) e *Elongation factor 2* (P13639).



**Figura 13.** Identificação do universo das proteínas quantificadas relativamente à quantidade de expressão em cada uma das três patologias, a partir da lista presente no OralCard.

Com o intuito de perceber e efectuar a triagem das proteínas glicosiladas, o gráfico da figura 14, efetua uma comparação entre cada uma

das patologias, relativamente às modificações pós-tradução de cada proteína quantificada. Assim, é de notar que na periodontite crónica, a maioria das proteínas com regulação aumentada são glicosiladas (12 proteínas), ao contrário da periodontite agressiva, cuja maioria das proteínas com regulação aumentada são fosforiladas. Pelo contrário, na periodontite crónica, a maioria das proteínas com regulação diminuída são fosforiladas e na periodontite agressiva, são também fosforiladas (10 proteínas). As proteínas comuns a estas duas patologias apresentam maioritariamente proteínas contra-reguladas (3 proteínas), cuja maioria é fosforilada (2 proteínas). Relativamente às proteínas com regulação aumentada em ambas as doenças, estas são na sua maioria glicosiladas (9 proteínas) e as proteínas reguladas negativamente são maioritariamente glicosiladas (5 proteínas).



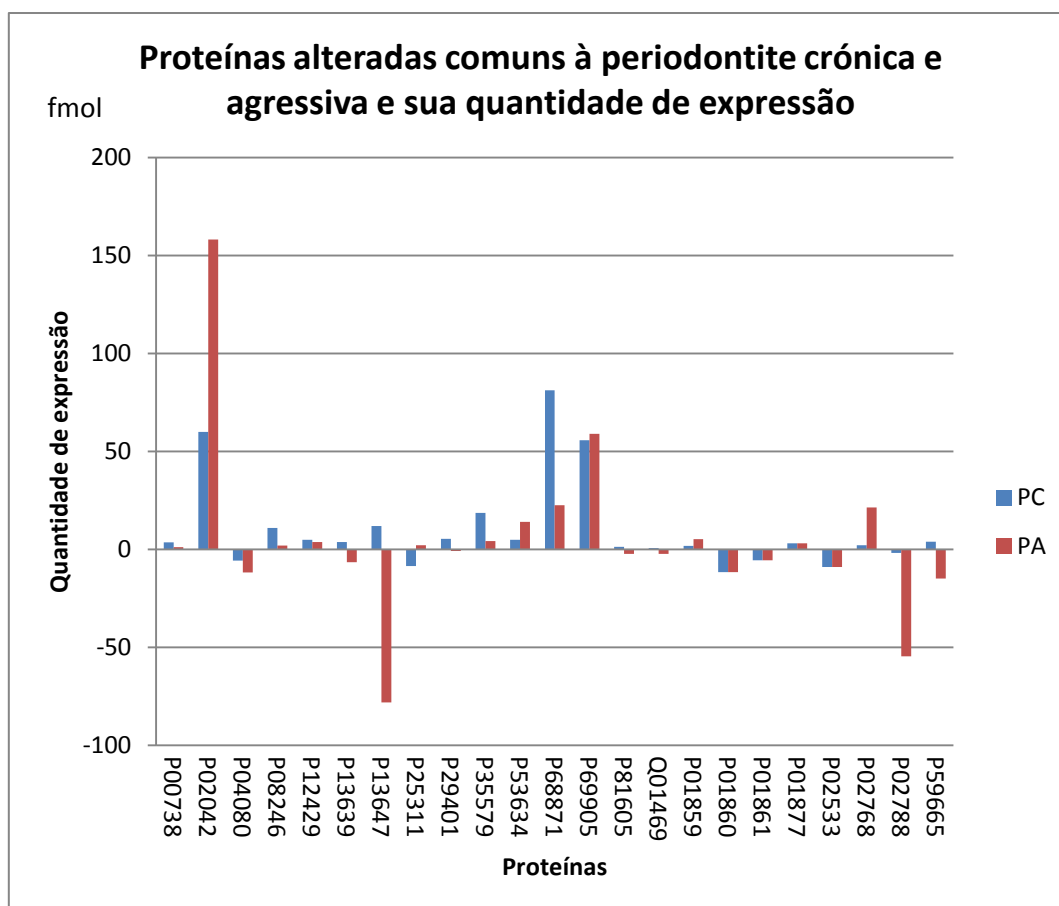
**Figura 14.** Identificação do universo das proteínas relativamente ao seu mecanismo pós-tradução e quantidade de expressão relativamente à alteração de expressão em cada uma das três patologias, a partir da lista presente no OralCard.



O gráfico da figura 14, apresenta as proteínas comuns à periodontite crónica e agressiva e verificou-se que na sua maioria são proteínas da família da queratina. Podemos verificar que existem 23 proteínas comuns com dados de quantificação entre as duas doenças. De entre essas proteínas 11 encontram-se com regulação aumentada, 5 com regulação diminuída e 7 contra-reguladas.

O gráfico da figura 13 e da figura 14 sugere que a maioria das proteínas quantificadas são glicosiladas, quer na periodontite crónica, quer na agressiva e estão maioritariamente sobre-reguladas. Na gengivite não foram publicados dados de quantificação das proteínas identificadas, o que requer mais estudos nesta etapa da doença periodontal.

A partir destes gráficos, elaborou-se o gráfico da figura 15, o qual ilustra as proteínas comuns à periodontite cónica e agressiva e, permite uma melhor percepção dos dados de quantificação da regulação de cada proteína em questão.



**Figura 15.** Gráfico representativo da quantificação das proteínas comuns à periodontite crónica e à periodontite agressiva. Cada uma das proteínas está distribuída pela periodontite crónica (coluna a azul) e pela periodontite agressiva (coluna a vermelho), com base nos dados de quantificação existentes no OralCard. Os resultados estão expressos em fmol de substrato clivado/ $\mu$ g de proteína/minuto. O nome das proteínas pode ser verificado pelo código Uniprot na secção anexos.

Relativamente ao gráfico da figura 15, este permitiu identificar as proteínas comuns à periodontite crónica e à periodontite agressiva para as quais existem dados de quantificação. As 23 proteínas identificadas como alteradas nestas duas doenças, são na sua maioria proteínas constituintes da membrana, bem como proteínas da circulação sanguínea. Foram identificadas 11 proteínas que apresentam regulação aumentada em ambas as patologias, e 5 proteínas que apresentam regulação diminuída nas duas patologias. De entre as proteínas que apresentam regulação aumentada nas duas patologias, existem proteínas relacionadas com a circulação sanguínea (*Hemoglobin*

*subunit alfa, Serum albumin, Haptoglobin, Hemoglobin subunit delta, Hemoglobin subunit beta*), proteínas inibidoras da fosfolipase A2 (*annexin A3*), proteases (*Neutrophil elastase, dipeptidyl peptidase 1*) e proteínas relacionadas com a organização do citoesqueleto (*Myosin-9*).

As proteínas que apresentam regulação diminuída em ambas as patologias são imunoglobulinas (*Ig gamma-3 chain C region, Ig gamma-4 chain C region*), proteínas da família da queratina (*Keratin, type I cytoskeletal 14, Keratin, type I cytoskeletal 14*), proteínas transportadoras (*lactotransferrin, Kaliocin-1*) e proteases (*Cystatin-B*).

As proteínas contra-reguladas, isto é que estão reguladas positivamente ou negativamente numa das patologias, são 7 e constituem proteínas membranares (*Keratin, type II cytoskeletal 5 e Dermcidin*), proteases (*Neutrophil defensin 1*), factores utilizados na síntese de outras proteínas (*Elongation factor 2*), proteínas relacionadas com o metabolismo dos lípidos (*Zinc-alpha-2-glycoprotein, Fatty acid-binding protein, epidermal*) e transferases (*Transketolase*),

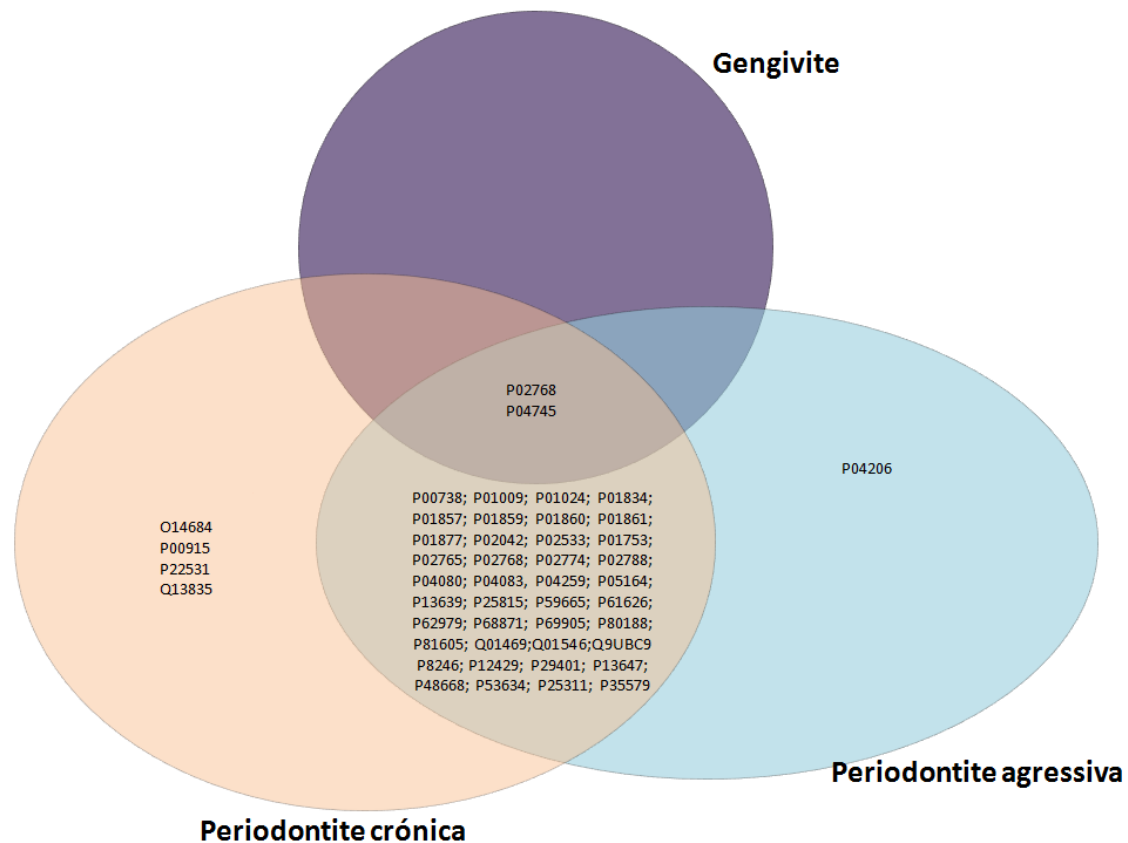
A proteína Zinc-alpha-2-glycoprotein (P25311), é interessante pelo facto de ser uma proteína contra-regulada, cuja expressão se revelou distinta entre as duas doenças, sendo de -8,5 na periodontite crónica e 2,2 na periodontite agressiva. É uma proteína responsável pela degradação de lípidos em adipócitos. A sua estrutura é semelhante à molécula MHC de classe 1, e participa em processos inflamatórios ou de destruição celular característicos da doença periodontal, como processos de *immune system* e *response to stimulus*. A sua função em condições fisiológicas e cancerígenas permanece desconhecida, mas é considerado um biomarcador do tumor para vários carcinomas<sup>(105)</sup>. Existem várias funções que lhe são atribuídas, como actividade de RNAase, a regulação da produção de melanina e o transporte de subprodutos nefróticos<sup>(105)</sup>.

#### 4.3. 2 Proteínas exclusivas da doença periodontal

As proteínas exclusivas da doença periodontal podem ser um indicador da presença ou evolução da doença. Nesse sentido, o universo das proteínas exclusivas da doença periodontal, com expressão alterada encontra-se representado no gráfico da figura 16. Foram identificadas 40 proteínas comuns à periodontite crónica e agressiva, das quais, na periodontite crónica é possível verificar que 4 proteínas são exclusivas da patologia e, na periodontite agressiva é possível encontrar 1 proteína exclusiva desta doença.

Relativamente à periodontite crónica, as proteínas exclusivas são à excepção da proteína *Prostaglandin E synthase* (O14684), proteínas relacionadas com processos metabólicos. A proteína *Carbonic anhydrase 1* (P00915) é uma proteína relacionada com o stress oxidativo, a proteína *Plakophilin-1* (Q13835) é uma proteína desmossomal, importante para a adesão e para a integridade da epiderme e a proteína *Small proline-rich protein 2E* (P22531), constitui uma proteína membranar da família da queratina e, não se encontra anotada na ferramenta bioinformática Panther. Por outro lado, a proteína *Prostaglandin E synthase* (O14684), possui quantidade de expressão aumentada na periodontite crónica e parece ser uma proteína interessante do ponto de vista biológico, na medida em que, intervém em ambos os processos de resposta a estímulos e do sistema imune, ou seja processos destrutivos característicos da doença periodontal. É uma enzima envolvida no metabolismo de eicosanóides e glutathione e é responsável pela conversão da ciclooxigenase (COX) e da prostaglandina (PG) em  $PGE_2$ <sup>(106)</sup>. A PGE citoplasmática (cPGES) é uma proteína que é expressa numa ampla variedade de células e tecidos, e está associada com proteínas de choque térmico 90 (Hsp90)<sup>(106)</sup>. Também pode ser um constituinte membranar (mPGES) e a sua expressão é controlada por glicocorticóides anti-inflamatórios<sup>(106)</sup>. Estes dois tipos de PGESs ligam-se a COXs distintas: cPGES está predominantemente associada à COX-1, enquanto que mPGES liga-se preferencialmente à COX-2<sup>(106)</sup>. Tem sido sugerido que mPGES participam em vários estados fisiopatológicos nos quais a COX-2 está envolvida, podendo constituir um novo alvo potencial para o desenvolvimento de terapêuticas<sup>(106)</sup>.

Relativamente à periodontite agressiva, a proteína exclusiva *Ig kappa chain V-III region GOL* (P04206), constitui uma porção de uma proteína imunoglobulina, mas não se encontra anotada no Panther. Como tal, não constitui uma proteína completa, logo não vai ser considerada para este estudo.



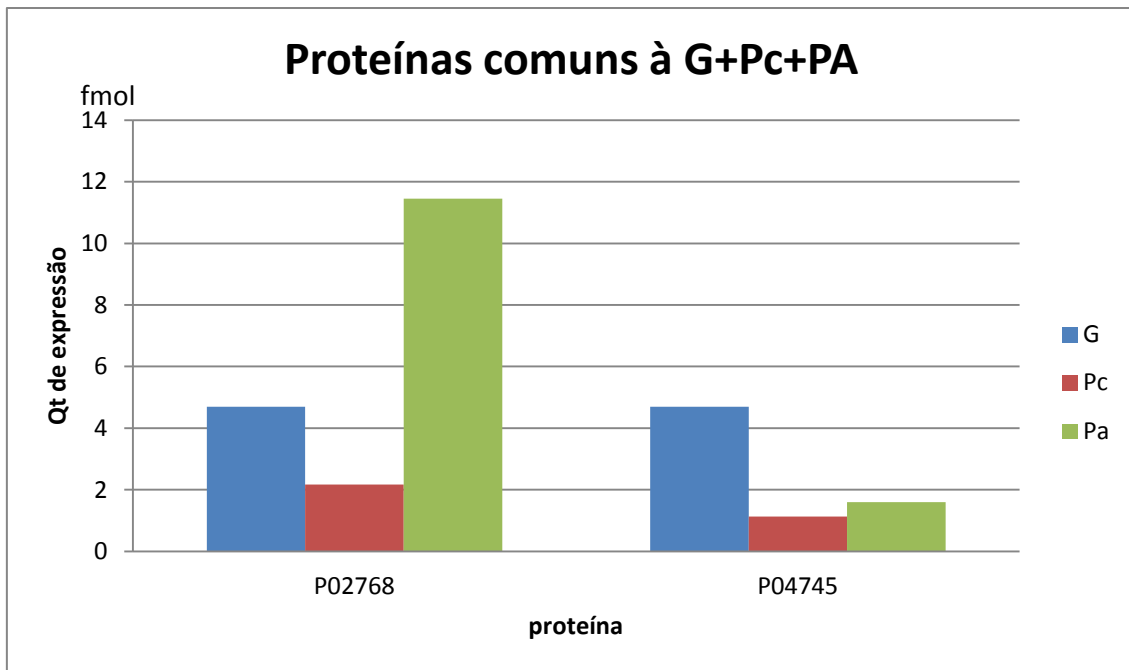
**Figura 16.** Identificação das proteínas exclusivas e comuns às 3 patologias a partir da lista de proteínas existente no OralCard. Este gráfico apresenta proteínas exclusivas de cada uma das três patologias, que não foram identificadas num indivíduo saudável, nem em qualquer outra doença, das quais integram proteínas modificadas (glicosiladas e fosforiladas) e não modificadas, e com regulação alterada (inclui as que apresentam dados de quantificação ou apenas indicação da expressão alterada). O nome das proteínas pode ser consultado na secção anexos.

#### 4.3.3 Proteínas alteradas comuns às três doenças

A partir do gráfico da figura 9, o qual apresentava o universo das proteínas comuns a todas as três patologias (11 proteínas) foi possível identificar 2 proteínas que apresentavam regulação alterada. Com o objectivo de identificar se existe algum mecanismo comum entre elas que justifique a evolução da doença periodontal, construiu-se o gráfico da figura 17.

Da análise do gráfico da figura 17, podemos constatar que em ambas as proteínas, identificadas nas três doenças, os seus níveis de expressão diferem com a doença. A proteína *serum albumin* (P02768), que constitui uma proteína glicosilada corresponde à principal proteína transportadora plasmática, nomeadamente de zinco e está também envolvida na regulação da pressão osmótica do sangue<sup>(107)</sup>. Por outro lado, a proteína *Alpha-amylase 1* (P04745), é uma proteína glicosilada presente na saliva, envolvida no processo metabólico do glicogénio<sup>(108)</sup>.

No entanto, estas duas proteínas não são indicadores viáveis da doença periodontal, porque além de serem secretadas em outras doenças, bem como no indivíduo saudável, apenas fornecem dados acerca do estado de saúde geral do indivíduo.



**Figura 17.** Gráfico representativo da quantidade de expressão das proteínas comuns à periodontite crônica e agressiva e à gengivite. A partir de um universo inicial de 11 proteínas comuns às três patologias, verificou-se que duas proteínas a proteína *sérum albumin* (P02768) e *Alpha-amylase 1* (P04745) apresentam regulação alterada. Apesar de apresentarem regulação aumentada, elas não constituem proteínas viáveis porque apenas fornecem dados acerca do estado de saúde geral do indivíduo e são produzidas sempre, independentemente do indivíduo apresentar ou não doença periodontal.

G- gengivite; Pc- periodontite crônica; PA-periodontite agressiva

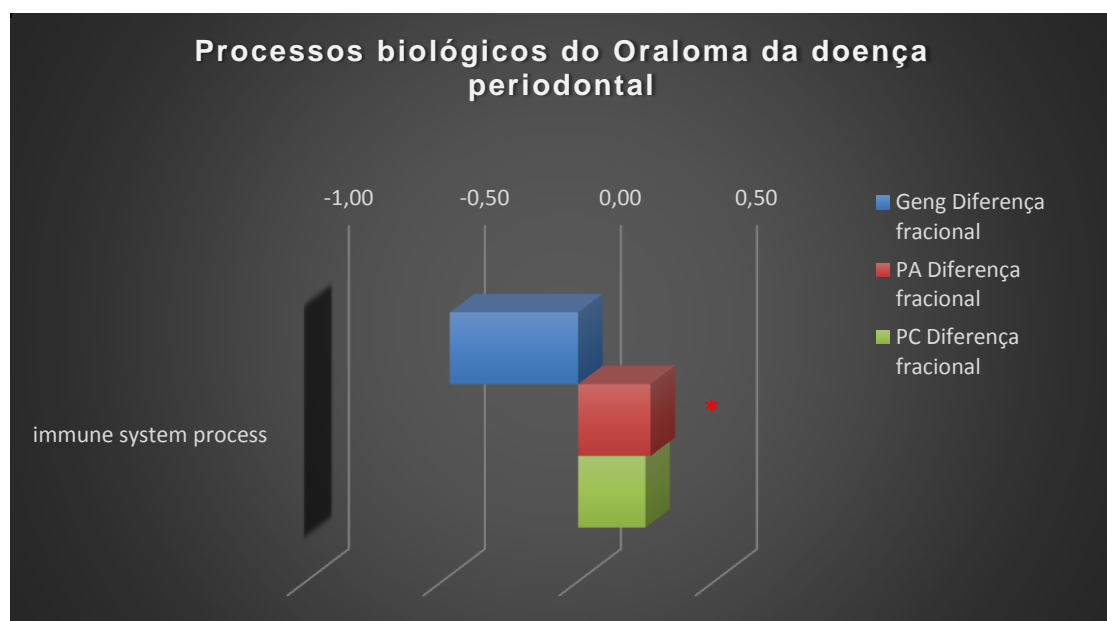
## 5. As principais proteínas com dados de quantificação identificadas na doença periodontal

### 5.1. Quais os processos biológicos em que participam as proteínas

Estando disponível as bases de dados do proteoma humano (OralCard e UniprotKB) é possível identificar o número de proteínas alteradas que participam em cada um dos processos biológicos e determinar se esse número

está alterado, com significado estatístico relativamente ao número de proteínas num indivíduo saudável. Esta análise permite identificar na doença periodontal, quais os processos biológicos que se encontram alterados. O cálculo de diferença fraccional entre o número de proteínas do proteoma humano implicados num determinado processo biológico e o número de proteínas identificadas em cada doença periodontal permite determinar a significância estatística, o valor de  $p$  que caso corresponda a  $p < 0,05$ , estaremos perante um processo biológico eventualmente comprometido.

Da análise do gráfico da figura 18, podemos concluir que 1 processo (*system process*) é considerado como significativamente alterado relativamente a um indivíduo saudável. As proteínas exclusivas da doença periodontal que participam nesse processo são: *Zinc-alpha-2-glycoprotein* (P25311) e *Prostaglandin E synthase* (O14684) e *Protein S100-A9* (P06702).



**Figura 18.** Diferença fraccional do oraloma da gengivite e periodontite crónica e agressiva em relação ao Oraloma normal. (\* valores com  $p\text{-value} < 0,05$ ), onde estão representados os processos significativamente alterados (*immune system process*) na doença periodontal.

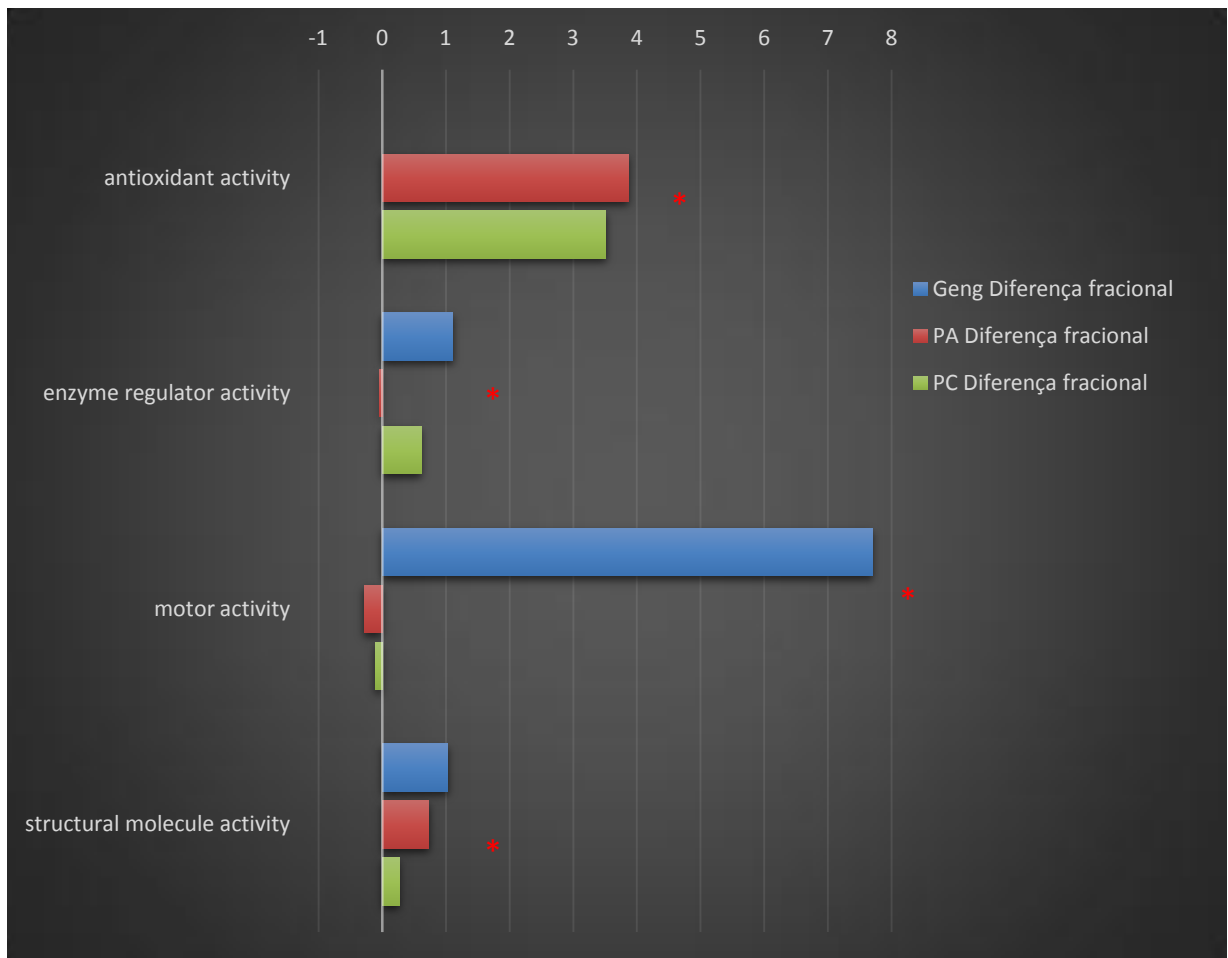


## 5.2 Quais as funções moleculares em que participam as proteínas

Neste estudo comparativo é possível identificar as proteínas alteradas que participam em diversas funções moleculares e avaliar se o número de proteínas que participam em cada função molecular é significativo relativamente ao indivíduo saudável.

Do estudo comparativo da ontologia génica de funções moleculares, verifica-se que apenas 4 apresentam significância estatística, como mostra o gráfico da figura 19. Essas 4 funções moleculares estão alteradas na doença periodontal relativamente a um paciente saudável, apresentando assim significância estatística,  $p < 0,05$  e são elas: *antioxidant molecule activity*, *structural molecule activity*, *motor activity* e *enzyme regulator activity*.

Verifica-se que na periodontite crónica, as proteínas *Plakophilin-1* (Q13835) e *Small proline-rich protein 2E* (P22531), apresentam a função de *structural molecule activity*, que se encontra alterada relativamente a um indivíduo saudável, o que significa que estão comprometidas na doença periodontal e também se verificam proteínas comuns à periodontite crónica e agressiva nas funções de: *enzyme regulator activity* (*Cystatin-B* (P04080), *Myosin-9* (P35579)); *structural molecule activity* (*Myosin-9* (P35579), *Keratin, type II cytoskeletal 6C* (P48668), *Keratin, type II cytoskeletal 5* (P13647), *Keratin, type I cytoskeletal 9* (P35527), *Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal* (P35908), *Plastin-2* (P13796), *Keratin, type II cytoskeletal 1* (P04264), *Myosin-9* (P35579)) e *motor activity* (*Myosin-9* (P35579)).



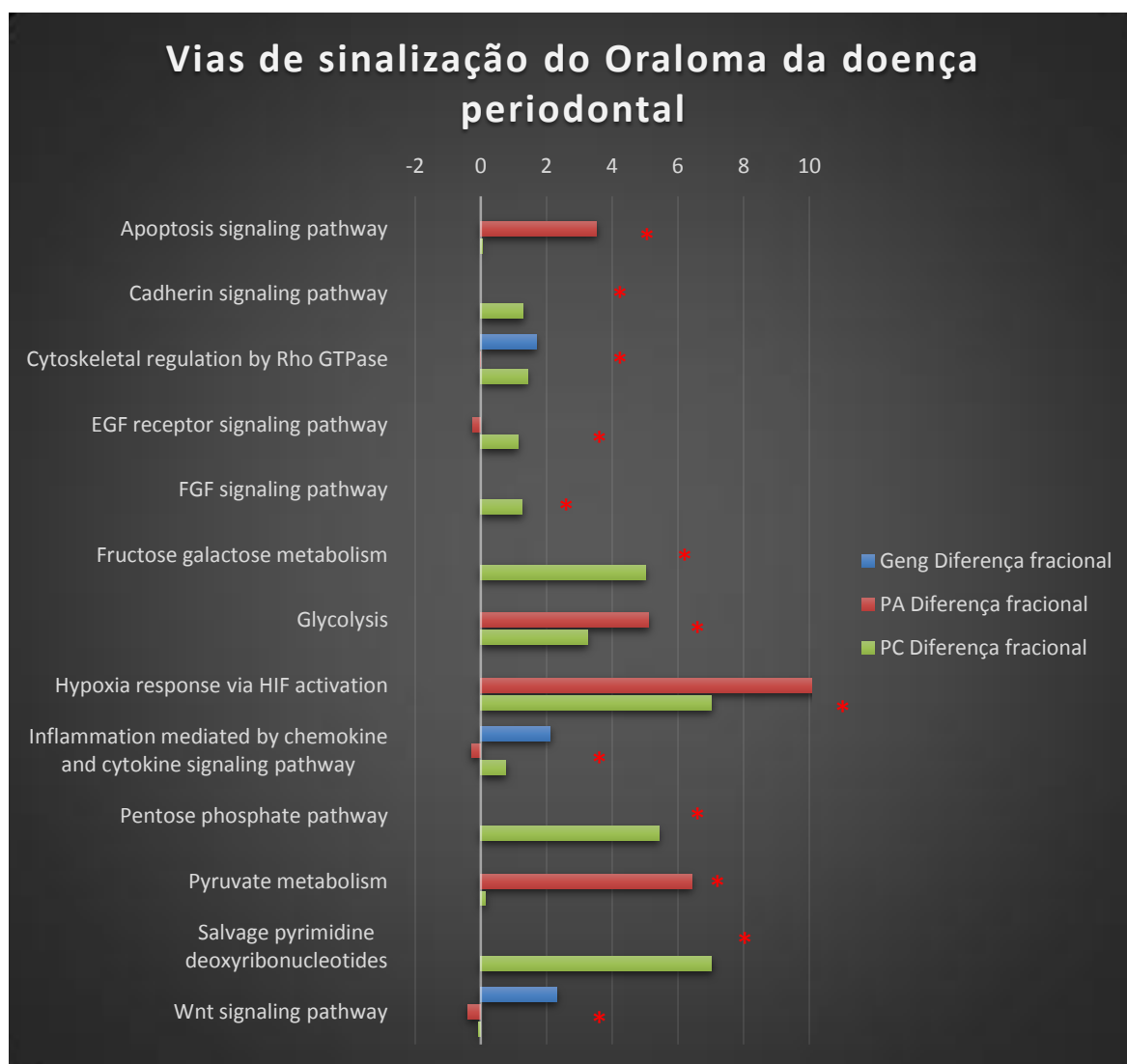
**Figura 19.** Diferença fraccional do oraloma da gengivite e periodontite crónica e agressiva em relação ao Oraloma normal (\* valores com  $p\text{-value} < 0,05$ ), que apresenta as funções moleculares significativamente alteradas na doença periodontal (*antioxidant activity*, *enzyme regular activity*, *motor activity* e *structural molecule activity*).

### 5.3 Quais as vias de sinalização em que participam as proteínas

Neste estudo comparativo, é possível identificar o número de proteínas alteradas em cada uma das vias de sinalização e perceber se esse número é significativo relativamente ao número de proteínas num indivíduo saudável. Do estudo comparativo da ontologia génica das vias de sinalização, verifica-se que 13 vias se encontram alteradas e estão representadas na figura 20.

As vias de sinalização comuns e alteradas nas três patologias são três (*cytoskeletal regulation by GTPase*, *inflammation mediated cytokine and chemokine* e *via de sinalização Wnt*). As vias de sinalização exclusivas alteradas são, na periodontite agressiva, a *via circadian clock system* e, na periodontite crônica, as vias de sinalização *receptor EGF*, *receptor FGF* e *fructose galactose signaling pathway*.

As vias comuns à periodontite crônica e à periodontite agressiva são: *Apoptosis signaling pathway*, *EGF receptor signaling pathway*, *Glycolysis*, *Hypoxia response via HIF activation* e *Pyruvate metabolism* e encontram-se alteradas relativamente a um indivíduo saudável.



**Figura 20.** Diferença fraccional do oraloma da gengivite e periodontite crónica e agressiva em relação ao Oraloma normal. (\* valores com  $p\text{-value}<0,05$ ), que representa as vias de sinalização significativamente alteradas na doença periodontal.

Das proteínas identificadas no gráfico da figura 16, a proteína *Myosin-9* (P35579), comum à periodontite crónica e agressiva, intervém nas vias *cytoskeletal regulation by GTPase*, e na *via inflammation mediated kitokyne and chemokyne* e, portanto estas vias estão alteradas na doença periodontal.

## 6. As evidências para possíveis biomarcadores em doença periodontal

O uso de biomarcadores para a detecção do início ou curso da doença periodontal, permitirá acompanhar ou prever a evolução da doença. Nesse sentido, e com base na quantificação de proteínas identificadas nas doenças periodontais, são apresentados possíveis biomarcadores que poderão ser considerados como tal uma vez testados experimentalmente.

Os biomarcadores propostos no presente trabalho basearam-se em critérios como exclusividade em relação à doença periodontal, isto é, não foram identificados em mais nenhuma patologia nem no indivíduo saudável, quantidade de expressão proteica (se esta se encontra alterada ou não relativamente ao Oraloma normal), importância da função molecular que desempenham na patologia e processo biológico em que intervêm.

Assim, a proteína *Prostaglandin E synthase* (O14684) preenche estes requisitos, na medida em que constitui uma proteína envolvida na inflamação crónica característica da periodontite crónica. Nunca antes proposta como biomarcador, a sua quantidade de expressão elevada, pode ser um indicador da instauração do processo inflamatório. A sua produção é controlada por TNF- $\alpha$  e uma vez estimulada com a COX-2 induz a produção de PGE<sub>2</sub>.<sup>(106)</sup> Realizou-se um estudo para perceber qual a contribuição das PGEs relativamente à inflamação induzida por PGE<sub>2</sub><sup>(79)</sup>. Foram realizadas experiências de cultura de células *in vitro* usando fibroblastos, células endoteliais do músculo liso e mastócitos de indivíduos com doença periodontal<sup>(79)</sup>. Como resultado, nestes tipos de células foi detectada uma expressão elevada de PGEs e COX-2, resultando em níveis basais elevados

de  $\text{PGE}_2$  <sup>(106)</sup>. Em resposta ao factor de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), em linfócitos co-cultivados, a expressão de mPGES-1 e COX-2 estava aumentada em fibroblastos e células musculares lisas e era acompanhada por um aumento da  $\text{PGE}_2$ , enquanto mPGES-2 e cPGES não foram afectados <sup>(79)</sup>. Estes resultados sugerem que os fibroblastos e células musculares lisas são importantes fontes de mPGES-1, e este pode contribuir para o aumento da produção de  $\text{PGE}_2$  na condição inflamatória da periodontite crónica, que como se verificou possui níveis elevados nesta patologia e pode, desta forma, ser um importante biomarcador desta doença <sup>(79)</sup>.

Outro biomarcador proposto por este trabalho consiste na proteína *Zinc-alpha-2-glycoprotein* (P25311) que, embora não seja exclusiva de um tipo de doença periodontal específico (é uma proteína comum à periodontite crónica e agressiva), mas pelo facto de ser encontrar contra-regulada, isto é, apresenta quantidade de expressão diminuída na periodontite crónica (-8,5) e aumentada na agressiva (2,2) esta poderá permitir diferenciar as duas patologias. No entanto, não se sabe muito sobre os mecanismos no qual esta proteína intervém na doença periodontal, isto porque, apenas se conhece a sua participação no metabolismo dos lípidos. Assim, sabe-se que Zinc- $\alpha$ 2-glicoprotein (ZAG) desempenha muitas funções importantes no corpo humano, incluindo a fertilização e a mobilização de lípidos <sup>(109)</sup>. Após a descoberta desta molécula, no decurso das últimas cinco décadas, vários estudos têm sido documentados acerca da sua estrutura e funções, mas ainda assim, considera-se uma proteína com uma função desconhecida, no entanto sabe-se que a sua expressão é regulada por glicocorticóides <sup>(109)</sup>. Devido à sua alta homologia com o factor de mobilização de lípidos e de elevada expressão no cancro, é considerada como uma nova adipocina. Por outro lado, a sua estrutura é semelhante à molécula MHC classe I apresentadora de antígeno, daí, ZAG poderá ter um papel na resposta imunitária. A função de ZAG em condições fisiológicas e cancerosas permanece desconhecida, mas é considerado como um biomarcador do tumor para vários carcinomas. Existem várias funções não relacionadas que são atribuídas a ZAG, como actividade RNase, a regulação da produção de melanina, o que dificulta a proliferação do tumor bem como o transporte de subprodutos nefróticos <sup>(110)</sup>.

Recentemente, a expressão de ZAG foi detectada no tumor da mama ou no tecido saudável da mama e em níveis elevados no carcinoma ductal e no tecido adjacente epitelial normal<sup>(110)</sup>. A influência de ZAG também foi estudada na obesidade, que é uma condição caracterizada por um aumento do tecido adiposo, infiltração de macrófagos e inflamação crônica de baixo grau<sup>(110)</sup>.

## 7. Glico-Oraloma da doença periodontal

O glico-Oraloma integra o conjunto de proteínas glicosiladas existentes na cavidade oral: humanas e bacterianas. Toda e qualquer acção que possa desencadear sobre proteínas do hospedeiro, nomeadamente modificação da glicosilação/desglicosilação (através quebra ou síntese das ligações glicosídicas, respetivamente) ou interações mediadas por glicoproteínas, poderá contribuir para a alteração funcional das proteínas envolvidas.

No capítulo anterior foram propostas 2 proteínas humanas como biomarcadores periodontais, uma das quais era uma glicoproteína (zinc-alpha-2-glycoprotein (P25311)) e a proteína *prostaglandin E synthase* (O14684).

Como se sabe a doença periodontal pode também ser desencadeada pela diabetes, principalmente pelos elevados níveis de glicose no sangue. Dado que os biomarcadores propostos se encontram alterados na doença periodontal é importante saber se poderiam ser também uma consequência de modificações produzidas por processos de glicação não enzimática irreversível (AEGs), cujo excesso de proteínas anómalas produzidas pelo mesmo, poderia levar à sua acumulação nas paredes de artérias, veias e capilares e aparentemente reduzir a absorção de nutrientes e oxigénio pelos tecidos gengivais com prejuízo da resposta leucocitária, o que poderia possibilitar o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento da doença periodontal.

Nesse sentido, sabe-se que a proteína *zinc-alpha-2-glycoprotein* (P25311), tem sido proposta como uma proteína envolvida na resistência à insulina e na lipólise. O tecido adiposo produz proteínas (adipocinas) que

modulam a sensibilidade à insulina e podem ter um papel na patogénese da diabetes<sup>(111)</sup>. A proteína *zinc-alpha-2-glycoprotein* (P25311) que apresenta regulação diminuída no tecido adiposo, actua através de receptores  $\beta_3$  - adrenérgicos, levando a um aumento na concentração de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), o que aumenta a lipólise<sup>(112)</sup>. Além disso, a expressão de ZAG é principalmente controlada pelo factor de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), cuja regulação negativa que exerce em ZAG pode ser um factor de acúmulo de lípidos nos adipócitos<sup>(113)</sup>. No entanto, os glicocorticóides também podem ter influência no aumento da expressão de ZAG<sup>(113)</sup>. Um estudo em ratos com caquexia concluiu que os glicocorticóides estimulam a lipólise através de um aumento na expressão de ZAG<sup>(114)</sup>.

Relativamente à prostaglandin E synthase (O14684), ela participa na conversão do ácido araquidónico em prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)<sup>(115)</sup>. A interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), frequentemente co-participantes em estados inflamatórios, constituem dois inibidores da secreção de insulina induzida pela glicose. Em diabéticos, ao efectuar-se um estudo para avaliar a produção de interleucina 1 beta, que é mediada por PGE<sub>2</sub>, verificou-se que a regulação de il-1 beta aumenta e a de mPGEs diminui, o que sugere a importância de mPGEs para a regulação de il-1 beta. Sabe-se que EP3, o subtipo de receptor de PGE<sub>2</sub>, cujo efeito é o de diminuir a actividade da adenilil-ciclase e, assim, a secreção de insulina, é o subtipo dominante expresso de ARNm. Conclui-se que a PGE<sub>2</sub> endógena medeia os efeitos inibidores de IL-1 $\beta$  exógeno sobre a função das células  $\beta$ <sup>(115)</sup>.



## 8. Conclusão

O glico-OralOma humano da doença periodontal integra o conjunto de proteínas glicosiladas existentes na cavidade oral na gengivite, na periodontite crónica e na periodontite agressiva. Das 520 proteínas encontradas em todas as patologias, a maioria das proteínas apresenta modificação pós-tradução, neste caso a glicosilação, principalmente na periodontite crónica (55 proteínas). Na gengivite, existe um menor número de proteínas glicosiladas (4 proteínas) que apresentam funções essencialmente estruturais, à excepção de *alfa-2-macroglobulin* (P01023), que é um inibidor de proteases, o que sugere que as proteínas fosforiladas poderão ter um maior contributo para o início da doença. Na periodontite crónica e agressiva, glicoproteínas inibidoras de proteases como *lactotransferrin* (P02788) e *neutrophil elastase* (P08246), podem ter um papel importante na evolução da doença. Assim como *neutrophil collagenase* (P22894), uma enzima responsável pela degradação de colagénio, que se apresenta aumentada na periodontite crónica e agressiva.

Neste trabalho foram propostas duas proteínas como biomarcadores. Os critérios utilizados para este efeito foram: exclusividade em relação à doença periodontal, quantidade de expressão proteica, importância da função molecular que desempenha na patologia e processo biológico em que participa. As proteínas que podem ser sugeridas como possíveis marcadores da doença periodontal, e que poderão ser testadas experimentalmente são a *Prostaglandin E synthase* (O14684) e *Nuclear transcription factor Y subunit alpha* (P23511). A proteína *Prostaglandin E synthase* (O14684), exclusiva da periodontite crónica, pode constituir um marcador da doença, quando a sua expressão estiver aumentada, significando que a inflamação está instaurada. A proteína *Nuclear transcription factor Y subunit alpha* (P23511) tem a sua expressão alterada em consequência dos factores segregados por macrófagos e TNF-alfa, apresentando diminuição de expressão na periodontite crónica e aumento na agressiva, consequência também dos processos destrutivos verificados, sendo também uma importante proteína que poderá permitir seguir o curso da doença.



## 9. Bibliografia

1. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature genetics*. 2003;33 Suppl:228-37.
2. Rodrigues AZ, Novaes Junior AB, Sousa SLSd, Grisi MFdM, Palioto DB, Taba Júnior M. Estratégias terapêuticas e potenciais alvos para modulação da resposta do paciente periodontal; Therapeutic strategies and potential targets for host response modulation of periodontal patients. *Periodontia*. 2009;19(1):14-21.
3. Lindhe J. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral: Guanabara Koogan; 2005.
4. Boehm T, Scannapieco F. The epidemiology, consequences and management of periodontal disease in older adults. *Journal of the American Dental Association (1939)*. 2007;138 Suppl.
5. Linden G, Lyons A, Scannapieco F. Periodontal systemic associations: review of the evidence. *Journal of periodontology*. 2013;84(4 Suppl).
6. Armitage G. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Northwest dentistry*. 2000;79(6):31-5.
7. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2004;34(1):9-21.
8. Van Dyke T, van Winkelhoff A. Infection and inflammatory mechanisms. *Journal of Clinical Periodontology*. 2013;40 Suppl 14:7.
9. Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontology 2000*. 2011;55(1):36-47.
10. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:503754.
11. Ji S, Choi Y. Innate immune response to oral bacteria and the immune evasive characteristics of periodontal pathogens. *Journal of periodontal & implant science*. 2013;43(1):3-11.

12. Van Dyke T. The management of inflammation in periodontal disease. *Journal of periodontology*. 2008;79(8 Suppl):1601-8.
13. Page R. The etiology and pathogenesis of periodontitis. *Compendium of continuing education in dentistry* (Jamesburg, NJ : 1995). 2002;23(5 Suppl):11-4.
14. Albandar J. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2002;29:177-206.
15. Noack B, Hoffmann T. Aggressive periodontitis. 2004.
16. Stefani F, Viana M, Dupim A, Brito J, Gomez R, da Costa J, et al. Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues. *Immunobiology*. 2012.
17. Cochran D. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of periodontology*. 2008.
18. Kantarci A, Van Dyke T. Resolution of inflammation in periodontitis. *Journal of periodontology*. 2005;76(11 Suppl):2168-74.
19. Berezow A, Darveau R. Microbial shift and periodontitis. *Periodontology 2000*. 2011;55(1):36-47.
20. Van Dyke TE, van Winkelhoff AJ. Infection and inflammatory mechanisms. *Journal of Clinical Periodontology*. 2013;40:S1-S7.
21. Gursoy U, Könönen E, Uitto V-J, Pussinen P, Hyvärinen K, Suominen-Taipale L, et al. Salivary interleukin-1 $\beta$  concentration and the presence of multiple pathogens in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2009;36(11):922-7.
22. Lee J-H, Choi Y-J, Heo S-H, Lee J-M, Cho J-Y. Tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme (TACE) increases RANKL expression in osteoblasts and serves as a potential biomarker of periodontitis. *BMB reports*. 2011;44(7):473-7.
23. Feng Y, Zhao H, Luderer H, Epple H, Faccio R, Ross F, et al. The LIM protein, Limd1, regulates AP-1 activation through an interaction with Traf6 to influence osteoclast development. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(1):39-48.
24. Curtis M, Zenobia C, Darveau R. The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. *Cell Host & Microbe*. 2011;10(4):302-6.

25. Bostanci N, Emingil G, Afacan B, Han B, Ilgenli T, Atilla G, et al. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE) levels in periodontal diseases. *Journal of dental research*. 2008;87(3):273-7.
26. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature Reviews Genetics*. 2003;4(8):638-49.
27. Roskamp L, Vaz R, Lima J. Fatores imunológicos envolvidos na reabsorção de tecido duro na doença periodontal. *Rev bras alerg imunopatol*. 2006.
28. Giannobile W, Al-Shammari K, Sarment D. Matrix molecules and growth factors as indicators of periodontal disease activity. *Periodontology 2000*. 2003;31:125-34.
29. Kinney J, Ramseier C, Giannobile W. Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1098:230-51.
30. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1092(1):385-96.
31. Okamoto K, Takayanagi H. [Osteoimmunology-overview]. *Clinical calcium*. 2012;22(11):1641-9.
32. Holmlund A, Hånström L, Lerner U. Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 2004;31(6):475-82.
33. Rylev M, Kilian M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008;35(8 Suppl):346-61.
34. Socransky S, Haffajee A. Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*. 2005;38:135-87.
35. Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent R. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*. 1998;25(2):134-44.
36. Scapoli L, Girardi A, Palmieri A, Testori... T. Microflora and periodontal disease. *Dental Research ....* 2013.
37. He J, Huang W, Pan Z, Cui H, Qi G, Zhou X, et al. Quantitative analysis of microbiota in saliva, supragingival, and subgingival plaque of Chinese adults with chronic periodontitis. *Clinical oral investigations*. 2012;16(6):1579-88.

38. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskin MA, et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host & Microbe*. 2011;10(5):497-506.
39. Tribble G, Kerr J, Wang B-Y. Genetic diversity in the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*: molecular mechanisms and biological consequences. *Future microbiology*. 2013;8(5):607-20.
40. Anton ARS, Dourado DC, Souza IA, Araujo RPCd. Proteases na doença periodontal; Protease in periodontal disease. *Pesqui bras odontopediatria clín integr*. 2007;6(3):295-302.
41. Rodrigues A, dos V, Júnior A. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS E POTENCIAIS ALVOS PARA MODULAÇÃO DA RESPOSTA DO PACIENTE PERIODONTAL.
42. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral diseases*. 2004;10(6):311-8.
43. Atila G, Sorsa T, Rönkä H, Emingil G. Matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) and neutrophil elastase in gingival crevicular fluid of cyclosporin-treated patients. *Journal of periodontology*. 2001;72(3):354-60.
44. Rai B, Kharb S, Jain R, Anand S. Biomarkers of periodontitis in oral fluids. *Journal of oral science*. 2008;50(1):53-6.
45. Maria Emanuel R, Lorne M G. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontology 2000*. 2000;24.
46. Laugisch O, Schacht M, Guentsch A, Kantyka T, Sroka A, Stennicke H, et al. Periodontal pathogens affect the level of protease inhibitors in gingival crevicular fluid. *Molecular oral microbiology*. 2012;27(1):45-56.
47. Xiao G, Gopalakrishnan R, Jiang... D. Bone Morphogenetic Proteins, Extracellular Matrix, and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways Are Required for Osteoblast-Specific Gene .... *Journal of Bone and ....* 2002.
48. Murthy M. Osteoimmunology - Unleashing the concepts. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2011;15(3):190-8.
49. Gordeladze J, Drevon C, Syversen U, Reseland J. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *Journal of cellular biochemistry*. 2002;85(4):825-36.

50. Uehara A, Takada H. Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. *Journal of dental research*. 2007;86(3):249-54.
51. Menezes R, Garlet T, Letra A, Bramante C, Campanelli A, Figueira R, et al. Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. *Journal of endodontics*. 2008;34(8):932-8.
52. Ryu J, Kim H, Chang E-J, Huang H, Banno Y, Kim H-H. Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *The EMBO journal*. 2006;25(24):5840-51.
53. Wehba C, Rodrigues AS, Soares FP, Brunetti M. Diabetes e doença periodontal: uma relação bidirecional. *Periodontia médica: uma abordagem integrada* 1ª ed São Paulo: Senac. 2003:171-95.
54. Groop P-H, Forsblom C, Thomas M. Mechanisms of disease: Pathway-selective insulin resistance and microvascular complications of diabetes. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2005;1(2):100-10.
55. King G. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *Journal of periodontology*. 2008.
56. Katz J, Bhattacharyya I, Farkhondeh-Kish F, Perez F, Caudle R, Heft M. Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease: a study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32(1):40-4.
57. Taylor G, Borgnakke W. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral diseases*. 2008;14(3):191-203.
58. Schmidt A, Weidman E, Lalla E, Yan S, Hori O, Cao R, et al. Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *Journal of periodontal research*. 1996;31(7):508-15.
59. Fabris P, Betterle C, Greggio N, Zanchetta R, Bosi E, Biasin M, et al. Insulin-dependent diabetes mellitus during alpha-interferon therapy for chronic viral hepatitis. *Journal of hepatology*. 1998;28(3):514-7.
60. Cai H, Chen H, Yi T, Daimon C, Boyle J, Peers C, et al. VennPlex--a novel Venn diagram program for comparing and visualizing datasets with differentially regulated datapoints. *PloS one*. 2013;8(1).

61. Mi H, Dong Q, Muruganujan A, Gaudet P, Lewis S, Thomas P. PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic acids research*. 2010;38(Database issue):10.
62. UniProt C. Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic acids research*. 2011;39(Database issue):9.
63. Houshmand B, Rafiei A, Hajilooi M, Mani-Kashani K, Gholami L. E-selectin and L-selectin polymorphisms in patients with periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2009;44(1):88-93.
64. Engebretson S, Vossughi F, Hey-Hadavi J, Emingil G, Grbic J. The influence of diabetes on gingival crevicular fluid beta-glucuronidase and interleukin-8. *Journal of clinical periodontology*. 2006;33(11):784-90.
65. Yamalik N, Günday S, Kilinc K, Karabulut E, Berker E, Tözüm T. Analysis of cathepsin-K levels in biologic fluids from healthy or diseased natural teeth and dental implants. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2011;26(5):991-7.
66. Cox S, Rodriguez-Gonzalez E, Booth V, Eley B. Secretory leukocyte protease inhibitor and its potential interactions with elastase and cathepsin B in gingival crevicular fluid and saliva from patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2006;41(5):477-85.
67. Thorat M, Pradeep A, Garg G. Correlation of levels of oncostatin M cytokine in crevicular fluid and serum in periodontal disease. *International journal of oral science*. 2010;2(4):198-207.
68. Hans S, Mali A. Estimation and comparison of osteopontin levels in plasma in subjects with healthy periodontium and generalized chronic periodontitis and its assessment after scaling and root planing. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2012;16(3):354-7.
69. Choi Y-J, Heo S-H, Lee J-M, Cho J-Y. Identification of azurocidin as a potential periodontitis biomarker by a proteomic analysis of gingival crevicular fluid. *Proteome science*. 2011;9:42.
70. Kinney J, Morelli T, Braun T, Ramseier C, Herr A, Sugai J, et al. Saliva/pathogen biomarker signatures and periodontal disease progression. *Journal of dental research*. 2011;90(6):752-8.
71. Tsuchida S, Satoh M, Umemura H, Sogawa K, Kawashima Y, Kado S, et al. Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel periodontal disease markers. *Proteomics*. 2012;12(13):2190-202.



72. Baliban R, Sakellari D, Li Z, DiMaggio P, Garcia B, Floudas C. Novel protein identification methods for biomarker discovery via a proteomic analysis of periodontally healthy and diseased gingival crevicular fluid samples. *Journal of clinical periodontology*. 2012;39(3):203-12.
73. Bostanci N, Heywood W, Mills K, Parkar M, Nibali L, Donos N. Application of label-free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MS E (gingival exudatome). *Journal of proteome research*. 2010;9(5):2191-9.
74. Gonçalves LDR, Soares M, Nogueira F, Garcia C, Camisasca D, Domont G, et al. Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *Journal of proteomics*. 2010;73(7):1334-41.
75. Wu Y, Shu R, Luo LJ, Ge LH, Xie YF. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects. *Journal of periodontal research*. 2009;44(5):636-44.
76. Costa P, Trevisan G, Macedo G, Palioto D, Souza S, Grisi M, et al. Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *Journal of periodontology*. 2010;81(3):384-91.
77. Haigh B, Stewart K, Whelan J, Barnett M, Smolenski G, Wheeler T. Alterations in the salivary proteome associated with periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2010;37(3):241-7.
78. Bertoldi C, Bellei E, Pellacani C, Ferrari D, Lucchi A, Cuoghi A, et al. Non-bacterial protein expression in periodontal pockets by proteome analysis. *Journal of clinical periodontology*. 2013;40(6):573-82.
79. Båge T, Kats A, Lopez B, Morgan G, Nilsson G, Burt I, et al. Expression of prostaglandin E synthases in periodontitis immunolocalization and cellular regulation. *The American journal of pathology*. 2011;178(4):1676-88.
80. Guentsch A, Hiese I, Puklo M, Kiehntopf M, Pfister W, Eick S. Variables of host response in saliva of patients with periodontitis: a pilot study. *Quintessence international* (Berlin, Germany : 1985). 2012;43(8):14.
81. Grant M, Creese A, Barr G, Ling M, Scott A, Matthews J, et al. Proteomic analysis of a noninvasive human model of acute inflammation and its resolution: the twenty-one day gingivitis model. *Journal of proteome research*. 2010;9(9):4732-44.
82. Ertugrul A, Sahin H, Dikilitas A, Alpaslan N, Bozoglan A. Evaluation of beta-2 microglobulin and alpha-2 macroglobulin levels in patients with different periodontal diseases. *Australian dental journal*. 2013;58(2):170-5.

83. Zhang S, Crivello A, Offenbacher S, Moretti A, Paquette D, Barros S. Interferon-gamma promoter hypomethylation and increased expression in chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2010;37(11):953-61.
84. Wu Y, Shu R, Liu H. [Comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy controls]. *Hua xi kou qiang yi xue za zhi = Huaxi kouqiang yixue zazhi = West China journal of stomatology*. 2011;29(5):519.
85. Chan H, Rahim Z, Jessie K, Hashim O, Taiyeb-Ali T. Salivary proteins associated with periodontitis in patients with type 2 diabetes mellitus. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(4):4642-54.
86. Gonçalves L, Soares M, Nogueira F, Garcia C, Camisasca D, Domont G, et al. Analysis of the salivary proteome in gingivitis patients. *Journal of periodontal research*. 2011;46(5):599-606.
87. Huynh Q, Wang S, Tafolla E, Gansky S, Kapila S, Armitage G, et al. Specific fibronectin fragments as markers of periodontal disease status. *Journal of periodontology*. 2002;73(10):1101-10.
88. Rangé H, Léger T, Huchon C, Ciangura C, Diallo D, Poitou C, et al. Salivary proteome modifications associated with periodontitis in obese patients. *Journal of clinical periodontology*. 2012;39(9):799-806.
89. Zhang F, Engebretson S, Morton R, Cavanaugh P, Subbaramaiah K, Dannenberg A. The overexpression of cyclo-oxygenase-2 in chronic periodontitis. *Journal of the American Dental Association (1939)*. 2003;134(7):861-7.
90. Stefani F, Viana M, Dupim A, Brito J, Gomez R, da Costa J, et al. Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues. *Immunobiology*. 2013;218(7):1012-7.
91. Tanaka M, Miyajima A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 2003;149:39-52.
92. Im E, Kazlauskas A. The role of cathepsins in ocular physiology and pathology. *Experimental eye research*. 2007;84(3):383-8.
93. Kim H-W, Mino K, Ishikawa K. Crystallization and preliminary X-ray analysis of endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Acta crystallographica Section F, Structural biology and crystallization communications*. 2008;64(Pt 12):1169-71.

94. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier P. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;170(6):3233-42.
95. Ujiie Y, Oida S, Gomi K, Arai T, Fukae M. Neutrophil elastase is involved in the initial destruction of human periodontal ligament. *Journal of periodontal research*. 2007;42(4):325-30.
96. Doan N, Gettins P. Human alpha2-macroglobulin is composed of multiple domains, as predicted by homology with complement component C3. *The Biochemical journal*. 2007;407(1):23-30.
97. Wang Q, Rajshankar D, Branch D, Siminovitch K, Herrera Abreu M, Downey G, et al. Protein-tyrosine phosphatase-alpha and Src functionally link focal adhesions to the endoplasmic reticulum to mediate interleukin-1-induced Ca<sup>2+</sup> signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(31):20763-72.
98. Bird S, Zou J, Savan R, Kono T, Sakai M, Woo J, et al. Characterisation and expression analysis of an interleukin 6 homologue in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*. *Developmental and comparative immunology*. 2005;29(9):775-89.
99. Ro Eanu A, Damian M, Evans RW. MECHANISMS OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LACTOFERRIN AND LACTOFERRIN-DERIVED PEPTIDES. 2010.
100. Bieth J. [The elastases]. *Journal de la Société de biologie*. 2001;195(2):173-9.
101. Moriuchi H, Moriuchi M, Fauci A. Cathepsin G, a neutrophil-derived serine protease, increases susceptibility of macrophages to acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology*. 2000;74(15):6849-55.
102. Kornman K. Interleukin 1 genetics, inflammatory mechanisms, and nutrigenetic opportunities to modulate diseases of aging. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;83(2).
103. Motyckova G, Fisher D. Pycnodysostosis: role and regulation of cathepsin K in osteoclast function and human disease. *Current molecular medicine*. 2002;2(5):407-21.
104. Javed F, Ahmed H, Saeed A, Mehmood A, Bain C. Whole Salivary Interleukin-6 and Matrix Metalloproteinase-8 Levels in Chronic Periodontitis Patients With and Without Prediabetes. *Journal of periodontology*. 2013.
105. Lei G, Brysk H, Arany I, Tying S, Srinivasan G, Brysk M. Characterization of zinc-alpha(2)-glycoprotein as a cell adhesion molecule that inhibits the proliferation of an oral tumor cell line. *Journal of cellular biochemistry*. 1999;75(1):160-9.

106. Båge T, Lindberg J, Lundeberg J, Modéer T, Yucel-Lindberg T. Signal pathways JNK and NF-kappaB, identified by global gene expression profiling, are involved in regulation of TNFalpha-induced mPGES-1 and COX-2 expression in gingival fibroblasts. *BMC genomics*. 2010;11:241.
107. Kolte R, Kolte A, Kohad R. Quantitative estimation and correlation of serum albumin levels in clinically healthy subjects and chronic periodontitis patients. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2010;14(4):227-30.
108. Baik J, Hong S, Choi S, Jeon J, Park OJ, Cho K, et al. Alpha-amylase is a human salivary protein with affinity to lipopolysaccharide of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Molecular oral microbiology*. 2013;28(2):142-53.
109. Katafigiotis I, Tyritzis S, Stravodimos K, Alamanis C, Pavlakis K, Vlahou A, et al. Zinc  $\alpha$ 2-glycoprotein as a potential novel urine biomarker for the early diagnosis of prostate cancer. *BJU international*. 2012;110(11 Pt B):93.
110. Mracek T, Gao D, Tzanavari T, Bao Y, Xiao X, Stocker C, et al. Downregulation of zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein in adipose tissue and liver of obese ob/ob mice and by tumour necrosis factor- $\alpha$  in adipocytes. *The Journal of endocrinology*. 2010;204(2):165-72.
111. Kahn B, Flier J. Obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(4):473-81.
112. Russell S, Tisdale M. The role of glucocorticoids in the induction of zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein expression in adipose tissue in cancer cachexia. *British journal of cancer*. 2005;92(5):876-81.
113. Russell S, Tisdale M. Role of  $\beta$ -adrenergic receptors in the anti-obesity and anti-diabetic effects of zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein (ZAG). *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1821(4):590-9.
114. Marrades M, Martínez J, Moreno-Aliaga M. ZAG, a lipid mobilizing adipokine, is downregulated in human obesity. *Journal of physiology and biochemistry*. 2008;64(1):61-6.
115. Tran P, Gleason C, Poitout V, Robertson R. Prostaglandin E(2) mediates inhibition of insulin secretion by interleukin-1 $\beta$ . *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(44):31245-8.

10. Anexo

10.1 Tabela do Oraloma da gengivite

UniProtKB AC	Name	Paroti	Parotid Exosomi	SM/SL	Minor	Whole Saliv	Crevicular Fluid	Mucos	Tongu	Healt	Disease (OMIM ID or Diseases Database)	Regulation	Age gro	Gende	Social Habits	Methods of Sampling	Methods of Analysis	Type of Study	PTM	Blomar	ation (NC)	Expressa
A3KN83	Protein strawberry notch homolog 1						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20662485	
A7E2Y1	Myosin-7B						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics			20662485	
Q9UKN7	Unconventional myosin-XV						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics			20662485	
A8TX70	Collagen alpha-5(VI) chain						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Glycoprotein Hydroxylation		20662485	
Q00203	AP-3 complex subunit beta-1						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20662485	
O14776	Transcription elongation regulator 1						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
O15014	Zinc finger protein 609						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q92665	28S ribosomal protein S31, mitochondrial						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics			20662485	
O15047	Histone-lysine N-methyltransferase SETD1A						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q9HAU5	Regulator of nonsense transcripts 2						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
O43295	SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 3						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20662485	
Q95678	Keratin, type II cytoskeletal 75						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
P01023	Alpha-2-macroglobulin					x				x	Gingivitis		25-50	M/F	pregnant, smoked, d	(at morning, 2 h after tooth brushing), sitting	LD-TOF/TOF + LC-ESI-MS +	Proteomics	Glycoprotein		23713636	
P01036	Cystatin-S					x				x	Gingivitis		25-50	M/F	pregnant, smoked, d	(at morning, 2 h after tooth brushing), sitting	LD-TOF/TOF + LC-ESI-MS +	Proteomics	Disulfide bond Phosphoprotein		20215060	
P01037	Cystatin-SN					x				x	Gingivitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	S/MS analysis following in-gel	Proteomics			21794177	
P01876	Ig alpha-1 chain C region					x				x	Gingivitis		25-45	M/F	p	(ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the	er version 2.3.5 was used to p	Proteomics	Disulfide bond Glycoprotein		20205380	
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A					x				x	Gingivitis		25-45	M/F	p	(ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the	er version 2.3.5 was used to p	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20205380	
Q9NR06	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 5						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics			20662485	
P02768	Serum albumin					x	x	alcohol u		x	Gingivitis	4,7	20-30	M/F	smoking; no alcohol u	unstimulated	espray ionization tandem mas	Proteomics	Cleavage on pair of basic residues		19453860	Aumentada
P02787	Serotransferrin						x			x	Gingivitis		25-45	M/F	p	(ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the	er version 2.3.5 was used to p	Proteomics	Disulfide bond Glycoprotein	x	20205380	
P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B					x				x	Gingivitis		25-50	M/F	pregnant, smoked, d	(at morning, 2 h after tooth brushing), sitting	LD-TOF/TOF + LC-ESI-MS +	Proteomics	Pyroldione carboxylic acid		20215060	
P04114	Apolipoprotein B-100						x			x	Gingivitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	S/MS analysis following in-gel	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		21794177	
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1					x	x			x	Gingivitis		25-45	M/F	p	(ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the	er version 2.3.5 was used to p	Proteomics	Phosphoprotein	x	20205380	
P04745	Alpha-amylase 1					x	x			x	Gingivitis	4,7	20-30	M/F	smoking; no alcohol u	unstimulated	espray ionization tandem mas	Proteomics	Disulfide bond Glycoprotein		20662485	Aumentada
P06702	Protein S100-A9					x				x	Gingivitis		25-45	M/F	p	(ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the	er version 2.3.5 was used to p	Proteomics	Phosphoprotein		20205380	
P10721	Mast/stem cell growth factor receptor Kit						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		20662485	
P11055	Myosin-3						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Methylation		20662485	
P12036	Neurofilament heavy polypeptide						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
P12273	Prolactin-inducible protein					x				x	Gingivitis		35-66	M/F	n-diabetic and no intake	provided 5ml of saliva by expectoration. Collected	PAGE + MALDI-TOF or (LC)	Proteomics	Glycoprotein		21794177	
P12883	Myosin-7						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
P13535	Myosin-8						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Methylation phosphoprotein		20662485	
Q9BXW6	Oxysterol-binding protein-related protein 1						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q9UG01	Intraflagellar transport protein 172 homolog						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
P16403	Histone H1.2						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
P17020	Zinc finger protein 16						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Acetylation		20662485	
Q92665	28S ribosomal protein S31, mitochondrial						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics			20662485	
Q9NYC9	Dynein heavy chain 9, axonemal						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics			20662485	
P23280	Carbonic anhydrase 6					x				x	Gingivitis		20-30	M/F	smoking; no alcohol u	unstimulated	espray ionization tandem mas	Proteomics	Disulfide bond Glycoprotein		19453860	
P25391	Laminin subunit alpha-1						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Disulfide bond Glycoprotein		20662485	
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9					x	x			x	Gingivitis		25-45	M/F	p	(ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the	er version 2.3.5 was used to p	Proteomics			20205380	
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal					x	x			x	Gingivitis		25-45	M/F	p	(ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the	er version 2.3.5 was used to p	Proteomics	Phosphoprotein		20205380	
P49914	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Acetylation		20662485	
P59666	Neutrophil defensin 3						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacteri	Proteomics	Disulfide bond Phosphoprotein	x	20662485	
P62805	Histone H4						x			x	Gingivitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	S/MS analysis following in-gel	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	

P62805	Histone H4							x			x	Gingivitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	US/MS analysis following in-gel	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
Q01082	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		20662485	
Q01546	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral							x			x	Gingivitis		25-45	M/F	p (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the	er version 2.3.5 was used to p	Proteomics	Phosphoprotein	x	20205380		
Q9NUJ22	Midasin							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20662485	
Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q12934	Filensin							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q14315	Filamin-C							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein Ubiquitination		20662485	
Q14643	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		20662485	
Q14980	Nuclear mitotic apparatus protein 1							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q14D04	Ventricular zone-expressed PH domain-containing protein homolog 1							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q9Y623	Myosin-4							x			x	Gingivitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	US/MS analysis following in-gel	Proteomics	Phosphoprotein		21794177		
Q9NUJ22	Midasin							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20662485	
Q15149	Plectin							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q5SXM1	Zinc finger protein 678							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	
Q5TC63	Growth hormone-regulated TBC protein 1							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	
Q6NUP7	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 4							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	
Q6UB98	Ankyrin repeat domain-containing protein 12							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20662485	
Q7ZSP9	Mucin-19							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Disulfide bond		20662485	
Q7ZBE9	E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20662485	
Q7Z7A1	Centriolin							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
P11055	Myosin-3							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Methylation		20662485	
Q8VFF2	Protein AHNK2							x			x	Gingivitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	US/MS analysis following in-gel	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		21794177		
Q8VFF4	Dynein heavy chain 10, axonemal							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	
Q8W19	MAX gene-associated protein							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q8IZT6	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q8N283	Ankyrin repeat domain-containing protein 35							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	
Q8NFU7	Methylcytosine dioxygenase TET1							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q12934	Filensin							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q8WVH0	Nesprin-2							x			x	Gingivitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	US/MS analysis following in-gel	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		21794177		
Q92499	ATP-dependent RNA helicase DDX1							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20662485	
Q92665	28S ribosomal protein S31, mitochondrial							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	
Q92736	Ryanodine receptor 2							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B							x			x	Gingivitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	US/MS analysis following in-gel	Proteomics	Glycoprotein		21794177		
P16403	Histone H1.2							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q96NW7	Leucine-rich repeat-containing protein 7							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q99698	Lysosomal-trafficking regulator							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q99758	ATP-binding cassette sub-family A member 3							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q14315	Filamin-C							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein Ubiquitination		20662485	
Q9BTL4	Immediate early response gene 2 protein							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	
Q9BW19	Kinesin-like protein KIFC1							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q9BWW6	Oxysterol-binding protein-related protein 1							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q9CDG0	Zinc finger protein 407							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	
Q9C0G6	Dynein heavy chain 6, axonemal							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	
P12883	Myosin-7							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A							x			x	Gingivitis		25-45	M/F	p (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the	er version 2.3.5 was used to p	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20205380		
Q9H251	Cadherin-23							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	
Q9H4E7	Differentially expressed in FDCP 6 homolog							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20662485	
Q9NUJ22	Midasin							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20662485	
Q9HAU5	Regulator of nonsense transcripts 2							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q9HC84	Mucin-5B							x			x	Gingivitis		25-50	M/F	pregnant, smoked, d (at morning, 2 h after tooth brushing), sitr	DI-TOF/TOF + LC-ESI/MS +	Proteomics	Disulfide bond Glycoprotein		20215060		
Q9NRC6	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 5							x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	

Q9NSB4	Keratin, type II cuticular Hb2						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	
Q9NUJ2	Midasin						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20662485	
Q9NYC9	Dynein heavy chain 9, axonemal						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	
Q9P0M2	A-kinase anchor protein 7 isoform gamma						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	
Q9P2D1	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q6NUP7	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 4						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	
Q9UBW8	COP9 signalosome complex subunit 7a						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20662485	
Q43295	SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 3						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20662485	
Q9UG01	Intracellular transport protein 172 homolog						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q9UKN7	Unconventional myosin-XV						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics			20662485	
Q9UMY1	Nucleolar protein 7						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Phosphoprotein		20662485	
Q9UPA5	Protein bassoon						x			x	Gingivitis		19-28	M/F	nonsmoking	to a cryotube (Appleton Woods, Birmingham)	66 supplemented with bacter	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		20662485	
Q9Y623	Myosin-4						x			x	Gingivitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	US/MS analysis following in-gel	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	

## 10.2 Tabela do Oraloma da periodontite crônica

UniProtKB AC	Name	Parotid	Parotid Exocyt	SM/SL	Minor	Whole saliva	Crevicular fluid	Mucosa	Tongue	Healthy	Disease (OMIM ID or Diseases Database)	Regulation	Age group	Gender	Social Habits	Methods of Sampling	Methods of Analysis	Type of Study	PTM	Biomarker	Citation (NCBI ID)	Expression	
P1551	E-selectin						x			x	chronic periodontitis			M/F		DNA was isolated from the whole blood and electrophoresed on 2% agarose gels. DNA was then digested with EcoRI and ligated with a 32P-labeled oligonucleotide.	Phosphoprotein	Non-Proteomics	Glycoprotein			15973547	
P08236	Beta-glucuronidase						x			x	chronic periodontitis			M/F		GCF was collected from eight posterior sites in each quadrant, and pooled for L-8 by ELISA and BG by a fluorimetric assay.	Proteomics	Glycoprotein				15911598	
P43235	Cathepsin K									M/F	GCF-PGF samples were obtained from natural teeth (group T) and from teeth with a commercially available catheter (group C).			M/F		The concentrations of active elastase and cathepsin B were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).	Non-Proteomics	Glycoprotein				22010081	
P07868	Cathepsin B						x			x	chronic periodontitis			M/F		The concentrations of active elastase and cathepsin B were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).	Proteomics	Glycoprotein				15963825	
P13725	Oncostatin-M						x			x	chronic periodontitis		25-50	M/F	(healthy), group II (gingivitis) and group III (chronic periodontitis). Group I was used as a control.	isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Glycoprotein	x		21404599	
P01579	Interferon gamma									M/F	chronic periodontitis			M/F				Proteomics	Glycoprotein				
P10451	Osteopontin									x	chronic periodontitis		20-45	M/F	History of systemic diseases (e.g., Diabetes Mellitus, ischemic heart disease) was recorded from the anamnesis.	Blood was withdrawn by venipuncture from the anterior arm of the patient.	ment and un-paired t-test to compare the two groups.	Non-Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein			23102328	
A0H5G5	Rheumatoid factor D5 light chain						x			x	chronic periodontitis			M/F		isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics				21794177	
A6K2U0	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1									x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Glycoprotein			21794177	
O00299	Chloride intracellular channel protein 1						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	
O00300	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B				x					x	chronic periodontitis			M/F	re excluded if they possessed a his(B). Samples were placed on ice (4°C) and used for measurement of M.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics/Non-Proteomics	Glycoprotein			21400910		
O00443	Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	
O00445	Mucin MUC5B						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics		x		21794177	
O00783	Acetyl-CoA carboxylase 2						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	
O14584	Prostaglandin E synthase							x			chronic periodontitis		35-55		The biopsies were taken during surgery as part of the normal oral anesthetic series. Immunohistochemistry was performed.		Non-Proteomics					21455451	
O15117	FYN-binding protein						x			x	chronic periodontitis					non-smoking, isolated.	Nanoflow...	Proteomics				21794177	
O15143	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	
O15144	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Acetylation			21794177	
O15145	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	
O15162	Phospholipid scramblase 1						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	
O15294	UDP-N-acetylglucosamine-6-phosphate 4-epimerase						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	
O43707	Alpha-actinin-4						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	
O43790	Keratin, type II acicular H6b						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Phosphoprotein	x		21794177	
O50216	Aldo-keto reductase family 1 member B10						x			x	chronic periodontitis		4-5			isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Acetylation			21794177	Diminuído
O75369	Filamin-B						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	
O95932	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 8						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics				21794177	
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	
P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn]						x			x	chronic periodontitis		2 36	M/F	ment for 6 months before the start of oral side of maxillary incisor.	Western blot	Non-Proteomics	Phosphoprotein	x		22623421	Aumentado	
P00460	Oxaloplatin						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein			21794177	
P01677	Ig alpha-2 chain C region				x					x	chronic periodontitis		3,1 20-30	M/F	non-smoking, no alcohol usage, unstimulated.	electrospray ionization tandem mass spectrometry.	Proteomics	Glycoprotein			19453850	Aumentado	
P00491	Purine nucleoside phosphorylase						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Acetylation			21794177	
P02751	Fibronectin						x			x	chronic periodontitis						immunoblotting and analyzed by NH-Image.	Non-Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein			12416706	
P00558	Phosphoglycerate kinase 1						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	
P00734	Prothrombin						x			x	chronic periodontitis					are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M).		Proteomics	Glycoprotein			22692770	
P00736	Complement C1r subcomponent						x			x	chronic periodontitis					are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M).		Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein			22692770	
P00738	Haptoglobin						x			x	chronic periodontitis		3,04 25-45	M/F	paper strip (PpFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal space.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Glycoprotein			20205330	Aumentado	
P00739	Haptoglobin-related protein						x			x	chronic periodontitis					are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M).		Proteomics	Disulfide bond			22692770	
P00747	Plasminogen						x			x	chronic periodontitis					are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M).		Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein			22692770	
P00751	Complement factor B						x			x	chronic periodontitis					are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M).		Proteomics	Glycoprotein			22692770	
P00915	Carbonic anhydrase 1						x				chronic periodontitis		+			isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Acetylation			21794177	Aumentado
P01008	Antithrombin-III						x			x	chronic periodontitis					are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M).		Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein			22692770	
P01009	Alpha-1-antitrypsin						x			x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (PpFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal space.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Glycoprotein	x		20205330		
P01019	Angiotensinogen						x			x	chronic periodontitis		-			ly digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M).		Proteomics	Glycoprotein	x		22692770	Diminuído
P01023	Alpha-2-macroglobulin					x				x	chronic periodontitis		25-50	M/F	using or pregnant, smoked, drank all morning, 2 h after both brushing.	MALDI-TOF/TOF + LC-ESI/MS + nLC.	Proteomics	Glycoprotein	x		20215090		
P01024	Complement C3						x			x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (PpFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal space.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein			20205330		
P01036	Cystatin-S					x				x	chronic periodontitis		25-50	M/F	using or pregnant, smoked, drank all morning, 2 h after both brushing.	MALDI-TOF/TOF + LC-ESI/MS + nLC.	Proteomics	Phosphoprotein	x		20215090		
P01037	Cystatin-SN						x			x	chronic periodontitis		-7,2			isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics		x		21794177	Diminuído
P01040	Cystatin-A						x			x	chronic periodontitis		-2,2			isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics		x		21794177	Diminuído
P01042	Kininogen-1						x			x	chronic periodontitis					are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M).		Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein			22692770	
P01584	Interleukin-1 beta					x	x			x	chronic periodontitis			M/F	re excluded if they possessed a his(B). Samples were placed on ice (4°C) and used for measurement of M.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics/Non-Proteomics				21400910		
P01591	Immunoglobulin J chain					x	x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Glycoprotein			21794177	
P01593	Ig kappa chain V-1 region AG						x			x	chronic periodontitis					isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals.	MS/MS analysis following in-gel digestion.	Proteomics	Disulfide bond			21794177	



P01593	Ig kappa chain V-I region AG							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Disulfide bond		21794177		
P01602	Ig kappa chain V4 region HK102							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Disulfide bond		21794177		
P01620	Ig kappa chain V-III region SE							x		x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Disulfide bond		22092770		
P01622	Ig kappa chain V-III region TI							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Disulfide bond		21794177		
P01764	Ig heavy chain V-III region VH6						x			x	chronic periodontitis		25-50	M/F	using or pregnant, smoked, drank alcohol, 2 h after tooth brushing	MALDI-TOF/TOF + LC-ESI-MS + nLC	Proteomics			20215090		
P01766	Ig heavy chain V-III region BRO							x		x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics			22092770		
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor						x			x	chronic periodontitis		25-50	M/F	using or pregnant, smoked, drank alcohol, 2 h after tooth brushing	MALDI-TOF/TOF + LC-ESI-MS + nLC	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		20215090		
P01834	Ig kappa chain C region							x		x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Disulfide bond		20205380			
P01867	Ig gamma-1 chain C region							x		x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Glycoprotein		20205380			
P04060	Cystatin-B							x		x	chronic periodontitis		-5.7	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Phosphoprotein		20205380	Diminuto		
P01869	Ig gamma-2 chain C region						x			x	chronic periodontitis		1.8	20-30	M/F	non-smoking, no alcohol usage, unstimulated	Proteomics	Glycoprotein	x	19453690	Aumentado	
P10451	Osteopontin									x	chronic periodontitis		20-45	M/F	History of systemic diseases (e.g., Diabetes Mellitus, ischemic heart	Blood was withdrawn by venipuncture from the anterior	ment and un-paired t-test to compare	Non-Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		23162326	
P01880	Ig gamma-3 chain C region							x		x	chronic periodontitis		-11.6	25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Glycoprotein	x	20205380	Diminuto	
P01881	Ig gamma-4 chain C region							x		x	chronic periodontitis		-5.6	25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Glycoprotein	x	20205380	Diminuto	
P01871	Ig mu chain C region							x		x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Glycoprotein		22092770		
P01876	Ig alpha-1 chain C region							x		x	chronic periodontitis		-4.7	25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Glycoprotein		20205380	Diminuto	
P01877	Ig alpha-2 chain C region						x			x	chronic periodontitis		3.1	20-30	M/F	non-smoking, no alcohol usage, unstimulated	Proteomics	Glycoprotein		19453690	Aumentado	
P02042	Hemoglobin subunit delta							x		x	chronic periodontitis		80	25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Phosphoprotein		20205380	Aumentado	
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14							x		x	chronic periodontitis		-9	25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Disulfide bond		20205380	Diminuto	
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A							x		x	chronic periodontitis		-54.5	25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Phosphoprotein		20205380	Diminuto	
P02947	Apolipoprotein A-I							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		21794177		
P02952	Apolipoprotein A-II							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein		21794177		
P02971	Fibrinogen alpha chain							x		x	chronic periodontitis		2.2		isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		21794177	Aumentado	
P02975	Fibrinogen beta chain							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein		21794177		
P02979	Fibrinogen gamma chain							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein		21794177		
P02751	Fibronectin							x		x	chronic periodontitis				immunoblotting and analyzed by NH-image	Non-Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		12416786			
P02753	Retinol-binding protein 4							x		x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Disulfide bond		20205380			
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1							x		x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Glycoprotein		20205380			
P01008	Antithrombin-III							x		x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		22092770		
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein							x		x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		22092770		
P02766	Transferrin							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein		21794177		
P02768	Serum albumin						x	x		x	chronic periodontitis		2.17	20-30	M/F	non-smoking, no alcohol usage, unstimulated	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		19453690	Aumentado	
P02774	Vitamin D-binding protein						x	x		x	chronic periodontitis		20-30	M/F	non-smoking, no alcohol usage, unstimulated	Proteomics	Glycoprotein		19453690			
P02787	Serotransferrin							x		x	chronic periodontitis		-10.4	25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein	x	20205380	Diminuto	
P02788	Lactotransferrin						x			x	chronic periodontitis		-1.7	20-30	M/F	non-smoking, no alcohol usage, unstimulated	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		19453690	Diminuto	
P02790	Hemopexin							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein		21794177		
P02812	Basic salivary proline-rich protein 2							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		21794177		
P02814	Submandibular gland androgen-regulated protein 3B						x			x	chronic periodontitis		25-50	M/F	using or pregnant, smoked, drank alcohol, 2 h after tooth brushing	MALDI-TOF/TOF + LC-ESI-MS + nLC	Proteomics	Pyridoxine carboxylic acid		20215090		
P03973	Antileukoprotease							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Disulfide bond	x	21794177		
P04004	Vitronection							x		x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		22092770		
P04040	Catalase							x		x	chronic periodontitis		2.7		isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	Aumentado	
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein		21794177		
P04080	Cystatin-B							x		x	chronic periodontitis		-5.7	25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Phosphoprotein		20205380	Diminuto	
P04083	Annexin A1							x		x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Phosphoprotein	x	20205380			
P04114	Apolipoprotein B-100							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		21794177		
P04196	Hasdine-rich glycoprotein							x		x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Glycoprotein		22092770		
P02015	Complement C4-B							x		x	chronic periodontitis		-		y digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Glycoprotein		22092770	Diminuto	
P04217	Alpha-1B glycoprotein							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein		21794177		
P04220	Ig mu heavy chain disease protein							x		x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		22092770		
P10599	Thioredoxin							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	MS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein		21794177		
P04259	Keratin, type II cytoskeletal 6B							x		x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Phosphoprotein	x	20205380			
P13946	Keratin, type I cytoskeletal 13							x		x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		20205380			
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1							x		x	chronic periodontitis		103.5	25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Phosphoprotein	x	20205380	Aumentado	
P04406	Glyoxaldehyde-3-phosphate dehydrogenase							x		x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into	Proteomics	Phosphoprotein		20205380			
P04745	Alpha-amylase 1						x			x	chronic periodontitis		1.13	20-30	M/F	non-smoking, no alcohol usage, unstimulated	Proteomics	Glycoprotein		19453690	Aumentado	

P04745	Alpha-amylase 1						x			x	chronic periodontitis	1,13	20-30	M/F	non-smoking; no alcohol usage	unstimulated	electrospray ionization tandem mass spectrometry	Proteomics	Glycoprotein			1945380	Aumentado
P04752	Heat shock protein beta-1						x			x	chronic periodontitis	-5,5			isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	Diminuido	
P05089	Arginase-1						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein			21794177		
P05090	Apolipoprotein D						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein			21794177		
P05109	Protein S100-A8						x			x	chronic periodontitis	2,31	35-65	M/F	diabetic, non-diabetic and no intake of oral 5ml of saline by expectoration	SDS-PAGE + MALDI-TOF or (LQ-MS	Proteomics	S-nitrosylation	x		20149214	Aumentado	
P05155	Plasma protease C1 inhibitor						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein			21794177		
P05164	Myeloperoxidase						x			x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal space	Protein version 2.3.5 was used to process the data	Proteomics	Glycoprotein	x		20205380		
P06231	Interleukin-6						x			x	chronic periodontitis	+	35-65	M/F	of antibiotics in the last 6 months, and saliva. Subjects obtained from	ELISA	Non-Proteomics	Glycoprotein			20192695	Aumentado	
P06312	Ig kappa chain V-IV region						x			x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Disulfide bond			22092770		
P06314	Ig kappa chain V-IV region B17						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Disulfide bond			21794177		
P06398	Gelsolin						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein			21794177		
P06702	Protein S100-A6						x			x	chronic periodontitis	43,7	25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal space	Protein version 2.3.5 was used to process the data	Proteomics	Phosphoprotein	x		20205380	Aumentado	
P06703	Protein S100-A6						x			x	chronic periodontitis	1,04	35-65	M/F	diabetic, non-diabetic and no intake of oral 5ml of saline by expectoration	SDS-PAGE + MALDI-TOF or (LQ-MS	Proteomics	Acetylation			20149214	Aumentado	
P06733	Alpha-enolase						x			x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal space	Protein version 2.3.5 was used to process the data	Proteomics	Phosphoprotein			20205380		
P06744	Glucose-6-phosphate isomerase						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein			21794177		
P07108	Acyl-CoA-binding protein						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein			21794177		
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein	x		21794177		
P07197	Neurofilament medium polypeptide						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein			21794177		
P07237	Protein disulfide-isomerase						x			x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Disulfide bond			22092770		
P04040	Catalase						x			x	chronic periodontitis	2,7			isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	Aumentado	
P07355	Annexin A2						x			x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal space	Protein version 2.3.5 was used to process the data	Proteomics	Phosphoprotein			23050690		
P07737	Profilin-1						x			x	chronic periodontitis	4,5	25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal space	Protein version 2.3.5 was used to process the data	Proteomics	Phosphoprotein	x		20205380	Aumentado	
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha						x			x	chronic periodontitis	-			isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	Diminuido	
P14823	Junction plakoglobin						x			x	chronic periodontitis	-			digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Phosphoprotein			22092770	Diminuido	
P07961	Tropomyosin beta chain						x			x	chronic periodontitis	-			digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Phosphoprotein			22092770	Diminuido	
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein	x		21794177		
P08246	Neutrophil elastase						x			x	chronic periodontitis	11			isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein	x		21794177	Aumentado	
P08311	Cathepsin G						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein			21794177		
P08575	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C						x				chronic periodontitis		35-65		The biopsies were taken during surgery as part of the normal care of the patients. Immunohistochemical analysis was performed on the biopsies.	Non-proteomics					21435491		
P08603	Complement factor H						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein			21794177		
P08670	Vimentin						x			x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Phosphoprotein			22092770		
P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19						x			x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal space	Protein version 2.3.5 was used to process the data	Proteomics	Phosphoprotein			20205380		
P08779	Keratin, type I cytoskeletal 10						x			x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal space	Protein version 2.3.5 was used to process the data	Proteomics	Phosphoprotein			20205380		
P09211	Glutathione S-transferase P						x			x	chronic periodontitis	-24,5			isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	Diminuido	
P09228	Cystatin-SA						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Disulfide bond	x		21794177		
P09900	Leukotriene A-4 hydrolase						x			x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Phosphoprotein			22092770		
P09972	Fructose-bisphosphate aldolase C						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein			21794177		
P03014	Complement C4-A						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein			21794177		
P03015	Complement C4-B						x			x	chronic periodontitis	-			digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Glycoprotein			22092770	Diminuido	
P10599	Thioredoxin						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein			21794177		
P10909	Clusterin						x			x	chronic periodontitis	-			digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein	x		22092770	Diminuido	
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein			21794177		
P05155	Plasma protease C1 inhibitor						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Glycoprotein			21794177		
P11387	DNA topoisomerase 1						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein			21794177		
P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein			21794177		
P12273	Protein-inducible protein						x			x	chronic periodontitis	-1,38	35-65	M/F	diabetic, non-diabetic and no intake of oral 5ml of saline by expectoration	SDS-PAGE + MALDI-TOF or (LQ-MS	Proteomics	Glycoprotein			20149214	Diminuido	
P12429	Annexin A3						x			x	chronic periodontitis	5			isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Acetylation	x		21794177	Aumentado	
P12814	Alpha-actinin-1						x			x	chronic periodontitis	8,8			isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Phosphoprotein			21794177	Aumentado	
P13489	Ribonuclease inhibitor						x			x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry (M		Proteomics	Phosphoprotein			22092770		
P13559	Elongation factor 2						x			x	chronic periodontitis		20-30	M/F	non-smoking; no alcohol usage	unstimulated	electrospray ionization tandem mass spectrometry	Proteomics	Phosphoprotein			1945380	
P13545	Keratin, type I cytoskeletal 10						x			x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal space	Protein version 2.3.5 was used to process the data	Proteomics	Phosphoprotein			20205380		
P13546	Keratin, type I cytoskeletal 13						x			x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal space	Protein version 2.3.5 was used to process the data	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein			20205380		
P13547	Keratin, type II cytoskeletal 5						x			x	chronic periodontitis	12	25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal space	Protein version 2.3.5 was used to process the data	Proteomics	Phosphoprotein	x		20205380	Aumentado	
P13796	Plastin-2						x			x	chronic periodontitis	13	25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal space	Protein version 2.3.5 was used to process the data	Proteomics	Phosphoprotein	x		20205380	Aumentado	
P14550	Alcohol dehydrogenase [NAD(P)+]						x			x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals	AMS/MS analysis following in-gel dig	Proteomics	Acetylation			21794177		
P14618	Pyruvate kinase PKM						x			x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal space	Protein version 2.3.5 was used to process the data	Proteomics	Phosphoprotein			20205380		

P14018	Pyruvate kinase PKM							x		x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted in	Proteomics	Phosphoprotein		20205380	
P14780	Matrix metalloproteinase-9							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Glycoprotein	x	21794177	Aumentado
P14823	Junction plakoglobin							x		x	chronic periodontitis	-			digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry M	Proteomics	Phosphoprotein		22062770	Diminuido
P15104	Glutamine synthetase							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P15153	Res-related C3 botulinum toxin substrate 2							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Methylation		21794177	
P15311	Ezrin							x		x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry M	Proteomics	Phosphoprotein		22062770	
P15324	Desmoglein							x		x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry M	Proteomics	Phosphoprotein		22062770	
P16152	Carbonyl reductase [NADPH 1							x		x	chronic periodontitis	-5.5			isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P16136	Ig kappa chain V-II region HC							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Disulfide bond		21794177	Diminuido
P16305	Vinculin							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P16510	Interleukin-1 receptor antagonist protein						x	x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Glycoprotein		21794177	
P30068	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P25908	Serpin B3							x		x	chronic periodontitis	-4			isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Acetylation		21794177	Diminuido
P19069	Phosphoglycerate mutase 1							x		x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry M	Proteomics	Phosphoprotein		22062770	
P19013	Keratin, type II cytoskeletal 4							x		x	chronic periodontitis		25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted in	Proteomics	Phosphoprotein	x	20205380	
P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		21794177	
P19927	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		21794177	
P19961	Alpha-amylase 2B							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Disulfide bond		21794177	
P19971	Thymidine phosphorylase							x		x	chronic periodontitis	-3.7			isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics			21794177	Diminuido
P20160	Acurodin							x		x	chronic periodontitis	7.3			isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics		x	21794177	Aumentado
P20848	Putative alpha-1-microglobulin-related protein							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Glycoprotein		21794177	
P21333	Filamin-A							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P12814	Alpha-actinin-1							x		x	chronic periodontitis	8.6			isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	Aumentado
P21817	Ryanodine receptor 1							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P22079	Lactoperoxidase							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		21794177	
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P35052	Glycopon-1							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Glycoprotein		21794177	
P22382	Nucleoside diphosphate kinase B							x		x	chronic periodontitis	-3.5			isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	Diminuido
P22528	Corrin-B							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P22531	Small proline-rich protein 2E						x	x			chronic periodontitis	mas			samples	Proteomics			22062770	Aumentado
P22884	Neutrophil collagenase						x			x	chronic periodontitis			M/F	are excluded if they possessed a high (B). Samples were placed on ice. (SA) were used for measurement of M	Proteomics/Non-Proteomics	Glycoprotein		21409010	
P40505	Malate dehydrogenase, mitochondrial							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P23280	Carbonic anhydrase 8						x			x	chronic periodontitis	-1.4	20-30	M/F	non-smoking; no alcohol usage	Proteomics	Glycoprotein		19453880	Diminuido
P23528	Cofilin-1							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P24158	Myeloblastin							x		x	chronic periodontitis	8.7			isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Glycoprotein		21794177	Aumentado
P24928	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P25311	Zn-alpha-2-glycoprotein						x			x	chronic periodontitis	-8.5	20-30	M/F	non-smoking; no alcohol usage	Proteomics	Glycoprotein		19453880	Diminuido
P25815	Protein S100-P							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics			21794177	
P25940	Collagen alpha-3(V) chain							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		21794177	
P26038	Moexin							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1							x		x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry M	Proteomics	Glycoprotein/ Phosphoprotein		22062770	
P27348	14-3-3 protein theta							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P27797	Calreticulin							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Glycoprotein		21794177	
P28325	Cystatin-D							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Disulfide bond	x	21794177	
P29034	Protein S100-A2							x		x	chronic periodontitis	-3.2			isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics			21794177	Diminuido
P29401	Transferlase							x		x	chronic periodontitis	5.37	25-45	M/F	paper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted in	Proteomics	Phosphoprotein		20205380	Aumentado
P29508	Serpin B3							x		x	chronic periodontitis	-4			isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Acetylation		21794177	Diminuido
P30041	Peroxisome-6							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P30944	Peroxisome-6, mitochondrial							x		x	chronic periodontitis				are typically digested with trypsin, eluted using high-performance liquid chromatography, and fragmented using tandem mass spectrometry M	Proteomics	Disulfide bond		22062770	
P40121	Macrophage-capping protein							x		x	chronic periodontitis	2			isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	Aumentado
P30895	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P30822	CAR-Gly domain-containing linker protein 1							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	
P30740	Leukocyte elastase inhibitor							x		x	chronic periodontitis	-1.9			isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Phosphoprotein	x	21794177	Diminuido
P30838	Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Acetylation		21794177	
P31025	Lipoassin-1							x		x	chronic periodontitis				isolated GCF from periodontitis patients and healthy indiv	Proteomics	Disulfide bond		21794177	









## 10.3 Tabela do Oraloma da periodontite agressiva

UniProtKB AC	Name	Parotid	Parotid Exom	SM/SL	Minor	Whole Saliva	Crevicular Fluid	Mucos	Tongue	Health	Disease (OMIM ID or Diseases Database)	Regulation	Age group	Gender	Social Habits	Methods of Sampling	Methods of Analysis	Type of Study	PTM	Biomark	Citation (NCBI)	Obs.
P15581	E-selectin						x			x	Aggressive periodontitis			M/F		DNA was isolated from the whole blood	g and L-selectin Phe206Leu polymorphisms using the polymerase chain reaction	Non-proteomics	Glycoprotein		18973547	
P43235	Cathepsin K						x			x	Aggressive periodontitis					GCF/PIISF samples were obtained from natural teeth (group T) and dental implants (group I) from patients with aggressive periodontitis and from healthy controls	determined with a commercially available cathepsin-K activity assay	Non-Proteomics	Glycoprotein		22010081	
O15056	Synaptotagmin-2						x			x	Aggressive periodontitis	-0.6	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	phosphoprotein		20205380	Diminuído
O95236	Apolipoprotein L3						x			x	Aggressive periodontitis	-1.5	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics			20205380	Diminuído
P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn]					x				x	Aggressive periodontitis		36	M/F		estment for 6 months before the start of the labial side of maxillary incisors without crown	Western blot	Non-Proteomics	Phosphoprotein		22623421	
P02787	Serotransferrin						x			x	Aggressive periodontitis	-10.4	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	glycoprotein	x	20205380	Diminuído
P00738	Haptoglobin						x			x	Aggressive periodontitis	1.1	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	glycoprotein		20205380	Aumentado
P02768	Serum albumin						x			x	Aggressive periodontitis	21.4	20-30	M/F	non-smoking; no alcohol usage	unstimulated	-DE + Electrospray ionization tandem mass spectrometry	Proteomics	Cleavage on pair of basic residues		19453860	Aumentado
p04206	Ig kappa chain V-II region GOL						x				Aggressive periodontitis	2.7	25-46	M/F	non-smoking; no alcohol usage	Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	ADP-ribosylation Acetylation		20205380	Aumentado
P01009	Alpha-1-antitrypsin						x			x	Aggressive periodontitis	-27.6	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	glycoprotein	x	20205380	Diminuído
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin						x			x	Aggressive periodontitis	-14.5	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	glycoprotein		20205380	Diminuído
P01024	Complement C3						x			x	Aggressive periodontitis	-1.3	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Cleavage on pair of basic residues		20205380	Diminuído
P01777	Ig heavy chain V-II region TEI						x			x	Aggressive periodontitis	2.8	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics			20205380	Aumentado
P01834	Ig kappa chain C region						x			x	Aggressive periodontitis	-8.7	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Disulfide bond		20205380	Diminuído
P01857	Ig gamma-1 chain C region						x			x	Aggressive periodontitis	-32.4	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	glycoprotein	x	20205380	Diminuído
P01859	Ig gamma-2 chain C region						x			x	Aggressive periodontitis	5.3	20-30	M/F	non-smoking; no alcohol usage	unstimulated	-DE + Electrospray ionization tandem mass spectrometry	Proteomics	glycoprotein	x	19453860	Aumentado
P01860	Ig gamma-3 chain C region						x			x	Aggressive periodontitis	-11.6	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	glycoprotein	x	20205380	Diminuído
P01861	Ig gamma-4 chain C region						x			x	Aggressive periodontitis	-5.6	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	glycoprotein Acetylation	x	20205380	Diminuído
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein						x			x	Aggressive periodontitis	3.1			non-smoking; no alcohol usage	From periodontitis patients and healthy individuals using a gelatin zymography	LC-ESI-MS/MS analysis following in-gel digestion	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		21794177	Aumentado
P01876	Ig alpha-1 chain C region						x			x	Aggressive periodontitis	-4.7	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	glycoprotein	x	20205380	Diminuído
P01877	Ig alpha-2 chain C region					x				x	Aggressive periodontitis	3.1	20-30	M/F	non-smoking; no alcohol usage	unstimulated	-DE + Electrospray ionization tandem mass spectrometry	Proteomics	glycoprotein	x	19453860	Aumentado
P02042	Hemoglobin subunit delta						x			x	Aggressive periodontitis	158.2	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20205380	Aumentado
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14						x			x	Aggressive periodontitis	-9	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Disulfide bond		20205380	Diminuído
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A						x			x	Aggressive periodontitis		25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein	x	20205380	
P52565	Rho GDP-dissociation inhibitor 1						x			x	Aggressive periodontitis	4.6				isolated GCF from periodontitis patients and healthy individuals using a gelatin zymography	LC-ESI-MS/MS analysis following in-gel digestion	Proteomics	Acetylation		21794177	Aumentado
P02753	Retinol-binding protein 4						x			x	Aggressive periodontitis	-3.3	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Disulfide bond		20205380	Diminuído
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1						x			x	Aggressive periodontitis	2.9	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Disulfide bond Glycoprotein		20205380	Aumentado
P02768	Serum albumin						x			x	Aggressive periodontitis	21.4	20-30	M/F	non-smoking; no alcohol usage	unstimulated	-DE + Electrospray ionization tandem mass spectrometry	Proteomics	Cleavage on pair of basic residues		19453860	Aumentado
P02774	Vitamin D-binding protein					x	x			x	Aggressive periodontitis	-14.6	20-30	M/F	non-smoking; no alcohol usage	unstimulated	-DE + Electrospray ionization tandem mass spectrometry	Proteomics	Glycoprotein		19453860	Diminuído
P02787	Serotransferrin						x			x	Aggressive periodontitis	-10.4	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	glycoprotein	x	20205380	Diminuído
P02788	Lactotransferrin					x				x	Aggressive periodontitis	-54.5	20-30	M/F	non-smoking; no alcohol usage	unstimulated	-DE + Electrospray ionization tandem mass spectrometry	Proteomics	glycoprotein	x	19453860	Diminuído
P04080	Cystatin-B						x			x	Aggressive periodontitis	-11.7	25-45	M/F	non-smoking; no alcohol usage	Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein	x	20205380	Diminuído
P04083	Annexin A1						x			x	Aggressive periodontitis	-8.1	25-45	M/F	non-smoking; no alcohol usage	Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein	x	20205380	Diminuído
p04206	Ig kappa chain V-II region GOL						x				Aggressive periodontitis	2.7	25-46	M/F	non-smoking; no alcohol usage	Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	ADP-ribosylation Acetylation		20205380	Aumentado
Q01546	Keratin, type I cytoskeletal 2 oral						x			x	Aggressive periodontitis	-6.4	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein	x	20205380	Diminuído
P04406	Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase						x			x	Aggressive periodontitis	-8.3	25-45	M/F	non-smoking; no alcohol usage	Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein		20205380	Diminuído
P04259	Keratin, type II cytoskeletal 6B						x			x	Aggressive periodontitis	-156.1	25-45	M/F		Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein	x	20205380	Diminuído
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1						x			x	Aggressive periodontitis	-44.3	25-45	M/F	non-smoking; no alcohol usage	Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein	x	20205380	Diminuído
P04745	Alpha-amylase 1					x				x	Aggressive periodontitis	1.6	20-30	M/F	non-smoking; no alcohol usage	unstimulated	-DE + Electrospray ionization tandem mass spectrometry	Proteomics	Glycoprotein		19453860	Aumentado
P05164	Myeloperoxidase					x	x			x	Aggressive periodontitis	3.7	25-45	M/F	non-smoking; no alcohol usage	Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Disulfide bond Glycoprotein	x	20205380	Aumentado
P05787	Keratin, type I cytoskeletal 8						x			x	Aggressive periodontitis	-4.2	25-45	M/F	non-smoking; no alcohol usage	Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Glycoprotein/Phosphoprotein	x	20205380	Diminuído
P06702	Protein S100-A9						x			x	Aggressive periodontitis	0.7	25-45	M/F	non-smoking; no alcohol usage	Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein	x	20205380	Aumentado
P06733	Alpha-enolase						x			x	Aggressive periodontitis	-1.5	25-45	M/F	non-smoking; no alcohol usage	Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein		20205380	Diminuído
P01024	Complement C3						x			x	Aggressive periodontitis	-1.3	25-45	M/F		Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal sulcus	GlobalSener version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Cleavage on pair of basic residues		20205380	Diminuído





P0C004	Ig lambda-1 chain C regions						x			x	Aggressive periodontitis	-8.2	25-45	M/F	non-smoking; no alcohol usage	Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Disulfide bond		20205380	Diminuido
P01777	Ig heavy chain V-II region TE1						x			x	Aggressive periodontitis	2.8	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics				20205380	Aumentado
P49736	DNA replication licensing factor MCM2						x			x	Aggressive periodontitis	1.2	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20205380	Aumentado	
P52565	Rho GDP-dissociation inhibitor 1						x			x	Aggressive periodontitis	4.6			isolated OCF from periodontitis patients and healthy individuals using a gelatin bead assay	LC-ESI-MS/MS analysis following in-gel digestion	Proteomics	Acetylation		21794177	Aumentado	
P53634	Dipeptidyl peptidase 1					x				x	Aggressive periodontitis	14	28-63	M/F	g collection to exclude any influence of mastication or foodstuffs. The seated patients collected the	Western blot	Non-Proteomics			23034426	Aumentado	
P54652	Heat shock-related 70 kDa protein 2						x			x	Aggressive periodontitis	1.2	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein	x	20205380	Aumentado	
P55081	Microfibrillar-associated protein 1						x			x	Aggressive periodontitis	1.1	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20205380	Aumentado	
P13797	Plastin-3						x			x	Aggressive periodontitis	9.8	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein		20205380	Aumentado	
P57053	Histone H2B type F-S						x			x	Aggressive periodontitis	71.2	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Acetylation Glycoprotein		20205380	Aumentado	
P59665	Neutrophil defensin 1						x			x	Aggressive periodontitis	-14.8	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein	x	20205380	Diminuido	
P61626	Lysozyme C						x			x	Aggressive periodontitis	-9.1	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Disulfide bond	x	20205380	Diminuido	
P62328	Thymosin beta-4						x			x	Aggressive periodontitis	1.1	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Acetylation Phosphoprotein		20205380	Aumentado	
P62805	Histone H4						x			x	Aggressive periodontitis	1.2			isolated OCF from periodontitis patients and healthy individuals using a gelatin bead assay	LC-ESI-MS/MS analysis following in-gel digestion	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	Aumentado	
P62807	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I						x			x	Aggressive periodontitis	67.9	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Glycoprotein/		20205380	Aumentado	
P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a						x			x	Aggressive periodontitis	1.3			isolated OCF from periodontitis patients and healthy individuals using a gelatin bead assay	LC-ESI-MS/MS analysis following in-gel digestion	Proteomics			20205380	Aumentado	
P63313	hymosin beta-10						x			x	Aggressive periodontitis	24.5	25-45	M/F		the ...	LC-ESI-MS/MS analysis following in-gel digestion	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	Aumentado
P68871	Hemoglobin subunit beta						x			x	Aggressive periodontitis	22.5			isolated OCF from periodontitis patients and healthy individuals using a gelatin bead assay	LC-ESI-MS/MS analysis following in-gel digestion	Proteomics	Glycoprotein/Phosphoprotein		21794177	Aumentado	
P69905	Hemoglobin subunit alpha						x			x	Aggressive periodontitis	59	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Glycoprotein/Phosphoprotein		20205380	Aumentado	
P78368	Casein kinase 1 isoform gamma-2						x			x	Aggressive periodontitis	0.5	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein		20205380	Aumentado	
P80388	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin						x			x	Aggressive periodontitis	18.9			isolated OCF from periodontitis patients and healthy individuals using a gelatin bead assay	LC-ESI-MS/MS analysis following in-gel digestion	Proteomics	Disulfide bond Glycoprotein		21794177	Aumentado	
P81605	Dermodin						x			x	Aggressive periodontitis	-2.3	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Acetylation		20205380	Diminuido	
Q01201	Transcription factor RelB						x			x	Aggressive periodontitis	-55.8	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein		20205380	Diminuido	
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal						x			x	Aggressive periodontitis	-2.2	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Acetylation Disulfide bond		20205380	Diminuido	
Q01546	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral						x			x	Aggressive periodontitis	-6.4	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein	x	20205380	Diminuido	
Q03169	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2						x			x	Aggressive periodontitis	-0.6	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics		x	20205380	Diminuido	
Q04695	Keratin, type I cytoskeletal 17						x			x	Aggressive periodontitis	-38.9	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein		20205380	Diminuido	
Q08828	Adenylate cyclase type 1						x			x	Aggressive periodontitis	1.1	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Glycoprotein		20205380	Aumentado	
Q13671	Ras and Rab interactor 1						x			x	Aggressive periodontitis	0.2	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Phosphoprotein		20205380	Aumentado	
Q61C08	ARHG protein						x			x	Aggressive periodontitis	2.1	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics			20205380	Aumentado	
P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a						x			x	Aggressive periodontitis	1.3			isolated OCF from periodontitis patients and healthy individuals using a gelatin bead assay	LC-ESI-MS/MS analysis following in-gel digestion	Proteomics			20205380	Aumentado	
Q86084	HP protein						x			x	Aggressive periodontitis	5.4	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics			20205380	Aumentado	
Q72636	FERM domain-containing protein 5						x			x	Aggressive periodontitis	0.5	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics			20205380	Aumentado	
P35579	Myosin-9						x			x	Aggressive periodontitis	4.2			isolated OCF from periodontitis patients and healthy individuals using a gelatin bead assay	LC-ESI-MS/MS analysis following in-gel digestion	Proteomics	Phosphoprotein		21794177	Aumentado	
Q99456	Keratin, type I cytoskeletal 12						x			x	Aggressive periodontitis	-26.6	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics			20205380	Diminuido	
Q9C075	Keratin, type I cytoskeletal 23						x			x	Aggressive periodontitis	-3.9	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics			20205380	Diminuido	
Q9C086	Kelch-like protein 4						x			x	Aggressive periodontitis	-1.8	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics			20205380	Diminuido	
Q9NP55	BPI fold-containing family A member 1					x				x	Aggressive periodontitis	1.9	20-30	M/F	non-smoking; no alcohol usage	unstimulated	-DE + Electrospray ionization tandem mass spectrometry	Proteomics	Glycoprotein		19453860	Aumentado
Q9UBC9	Small proline-rich protein 3						x			x	Aggressive periodontitis	-2.4	25-45	M/F	Sterile Periopaper strip (ProFlow Inc., Amityville, NY) was then gently inserted into the periodontal pocket	GlobalServer version 2.3.5 was used to process all data	Proteomics	Acetylation		20205380	Diminuido	